



**DENEYSEL PERİODONTİTİS OLUŞTURULMUŞ  
RATLARDA PISTACIA EURYCARPA YALT.  
UYGULAMASININ PERİODONTAL KEMİK  
YIKIMI VE OKSİDATİF STRES ÜZERİNE  
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ  
Mustafa ATALAY  
PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Tez Danışmanı**

**Doç. Dr. Mustafa Özay USLU  
Uzmanlık Tezi 2021**

**T.C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ DEKANLIĞI**

**DENEYSEL PERİODONTİTİS OLUŞTURULMUŞ RATLARDA PISTACIA  
EURYCARPA YALT. UYGULAMASININ PERİODONTAL KEMİK YIKIMI  
VE OKSİDATİF STRES ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**Mustafa ATALAY**

**Periodontoloji Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi**

**Tez Danışmanı  
Doç. Dr. Mustafa Özay USLU**

Bu Araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi  
Tarafından TDH-2021-2330 Proje numarası ile desteklenmiştir.

**MALATYA  
2021**

# KABUL VE ONAY

## UZMANLIK TEZİ TUTANAĞI

Periodontoloji Anabilim Dalı uzmanlık öğrencisi Araştırma Görevlisi Mustafa ATALAY'ın "Deneysel Periodontitis Oluşturulmuş Ratlarda Pistacia Eurycarpa Yalt. Uygulamasının Periodontal Kemik Yıkımı ve Oksidatif Stres Üzerine Etkilerinin İncelenmesi" isimli tezi 23.12.2021 tarihinde aşağıda isimleri yer alan jürimiz tarafından incelenerek başarılı bulunmuş ve kendisinin sınava alınmasına karar verilmiştir.

### Jüri Başkanı

Doç. Dr. Oğuz KÖSE  
Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi  
Diş Hekimliği Fakültesi  
Periodontoloji A.D Öğretim Üyesi

### Jüri Üyesi

Doç. Dr. Mustafa Özay USLU  
İnönü Üniversitesi  
Diş Hekimliği Fakültesi  
Periodontoloji A.D Öğretim Üyesi

### Jüri Üyesi

Doç. Dr. Cüneyt Asım ARAL  
İnönü Üniversitesi  
Diş Hekimliği Fakültesi  
Periodontoloji A.D Öğretim Üyesi

### Onay

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

Prof. Dr. Alaadin POLAT  
İnönü Üniversitesi  
Diş Hekimliği Fakültesi Dekanı

**Uzmanlık Tezi**  
**MALATYA 2021**

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	viii
ABSTRACT.....	ix
SİMGELER VE KISALTIMA DİZİNİ .....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xii
TABLolar DİZİNİ .....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Periodontal Hastalık.....	3
2.1.1. Gingivitis ve Periodontitisin Histolojik Aşamaları .....	3
2.1.2. Periodontitis Etiyolojisi .....	6
2.1.3. Periodontal Hastalık Patogenezi .....	7
2.1.4. Periodontal Hastalıkların Sınıflandırması .....	11
2.2. Sitokinler.....	13
2.2.1. İnterlökin-1 Ailesi.....	14
2.2.2. İnterlökin 10 .....	17
2.3. Serbest Radikaller .....	17
2.4. Reaktif Oksijen Türleri ve Periodontitis .....	18
2.4.1. Reaktif Oksijen Türlerinin Homeostazı.....	19
2.4.2. Reaktif Oksijen Türlerinin Periodontitis İle İlişkisi .....	19
2.4.3. Lipid Peroksidasyon .....	22
2.4.4. Protein Hasarı .....	22
2.4.5. Pro-enflamatuvar Sitokinler Üzerinden Etki .....	23
2.5. Antioksidan Defans Sistemleri.....	23
2.6. Reaktif Oksijen Türleri ve Periodontitis Üzerine Etkisi .....	26
2.6.1. Apoptoz Artışı .....	27
2.7. Pistacia Cinsi.....	27

2.7.1.	<i>Pistacia eurycarpa</i> Yalt. Bitkisi ve Özellikleri.....	27
2.8.	Deney Hayvanı Modelleri.....	28
2.8.1.	Defekt Oluşturulması.....	29
2.8.2.	Deney Hayvanları .....	30
2.8.3.	Ligatür ile Periodontitis Oluşturulması .....	31
3.	MATERYAL VE METOT .....	33
3.1.	Deney Hayvanları .....	33
3.2.	Deney Grupları.....	33
3.3.	Çalışma Planı .....	34
3.4.	DeneySEL Periodontitis Oluşturulması.....	34
3.5.	<i>P. eurycarpa</i> Ekstresinin Hazırlanması ve Oral Gavaj İle Uygulanması .....	35
3.6.	Hayvanların Sakrifiye Edilmesi ve Doku Örneklerinin Alınması .....	37
3.7.	Biyokimyasal Analizler.....	38
3.7.1.	Dokuların Biyokimyasal Analizlere Hazırlanması.....	38
3.7.2.	GSH-Px, SOD, MDA, IL-1B, IL-10 Düzeylerinin Ölçümü .....	38
3.7.3.	ELISA Kit Prosedürü.....	38
3.7.4.	Total Oksidatif Seviye (TOS) Ölçümü .....	39
3.7.5.	Total Antioksidan Seviye (TAS) Ölçümü .....	39
3.8.	Mikro Bilgisayarlı Tomografi İncelemelerinin Yapılması .....	40
3.9.	Verilerin İstatistiksel Analizi .....	41
4.	BULGULAR.....	43
4.1.	Biyokimyasal Sonuçlar .....	43
4.1.1.	IL-1 $\beta$ ve IL-10 Seviyeleri .....	43
4.1.2.	GSH-Px, MDA ve SOD Seviyeleri .....	44
4.1.3.	TOS, TAS ve OSI Seviyeleri.....	46
4.2.	Mikro BT Ölçümleri .....	48
5.	TARTIŞMA .....	50

6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	63
KAYNAKLAR .....	64
EKLER.....	91
EK - 1. ÖZGEÇMİŞ .....	91
EK - 2. HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI.....	92



## TEŐEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi birikimi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren, klinik ve akademik çalışmalarım da büyük emeği geçen, tez hazırlama sürecinde ihtiyacım olan her türlü yardım, öneri ve desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam, **Doç. Dr. Mustafa Özay USLU**'ya;

Eğitimim boyunca çalışmalarım da bilgilerini ve tecrübelerini benimle paylaşan değerli hocalarım **Doç. Dr. Cüneyt Asım ARAL**, **Dr. Öğr. Üyesi Arife SABANCI**, **Dr. Öğr. Üyesi Vesile Elif TOY**, **Dr. Öğr. Üyesi Ömer Alperen KIRMIZIGÜL**, **Dr. Öğr. Üyesi Kübra ARAL**'a;

Asistanlık sürecinin her aşamasında birbirimize destek olduğumuz saygıdeğer arkadaşım ve meslektaşım **Sami Barış KESKİN**'e;

Birlikte çalışma şansı bulduğum tüm asistan hekim arkadaşlarıma;

Projemizi desteklediği için İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne;

Yetişmemde büyük çaba ve özveri gösteren, beni her zaman destekleyen sevgili annem **Asiye ATALAY**, babam **Cengiz ATALAY** ve kardeşim **İsmail ATALAY**'a;

Her zaman yanımda olan, varlığı ile bana güç ve mutluluk veren, tez çalışması sürecinde başım her sıkıştığında yardımını esirgemeyen sevgili eşim, **Dr. Merve ATALAY**'a;

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

### **DeneySEL Periodontitis Oluşturulmuş Ratlarda Pistacia Eurycarpa Yalt. Uygulamasının Periodontal Kemik Yıkımı ve Oksidatif Stres Üzerine Etkilerinin İncelenmesi**

**Amaç:** Bu çalışmada, deneysel periodontitis modelinde *P. eurycarpa Yalt.* bitki ekstresinin sistemik uygulamasının alveolar kemik kaybı ve dişeti dokusu biyokimyasal parametreleri üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlandı.

**Gereç ve Yöntem:** İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nde üretilen 200-250 g ağırlıklarında 32 adet Wistar-Albino türü rat çalışmaya dahil edildi. Ratlar 4 eşit (n=8) gruba ayrıldı: SK, DPK, DP400, DP800. Deneysel periodontitis maksiller sağ 2. molar dişe ligatür bağlanması ile oluşturuldu. SK ve DPK gruplarına distile su, DP400 ve DP800 gruplarına ise sırasıyla 400 mg/kg ve 800 mg/kg dozlarında bitki ekstratı oral gavaj yolu ile uygulandı. 15. günde ratlar sakrifiye edildi. Dişeti dokularında GSH-Px, MDA, SOD, IL-1 $\beta$ , IL-10, TAS, TOS, OSI değerleri ELISA yöntemiyle incelendi. Mikro-BT ile elde edilen maksilla görüntüleri üzerinde ise alveolar kemik kaybı miktarları incelendi.

**Bulgular:** Sağlıklı grup IL-1 $\beta$ , TOS, OSI değerleri, diğer grup değerlerinden düşük olarak bulunurken, TAS değerleri diğer gruplardan yüksek bulundu (p<0.05). Biyokimyasal parametreler açısından DPK, DP400 ve DP800 grupları arasında anlamlı bir fark gözlemlenmedi (p>0.05). Kemik kaybı, ORT-M değerlerinde SK tüm gruplara göre, DP400 ve DP800 grupları DPK grubuna göre anlamlı derecede düşük olarak bulundu (p<0.05). ORT-D değerleri ise SK grubunda tüm gruplardan, DP800 grubunda DPK grubundan daha düşük bulundu (p<0.05).

**Sonuç:** Bu çalışmanın sınırları dahilinde sistemik *P. eurycarpa* ekstresi uygulamasının deneysel periodontitis üzerinde kemik kaybını azaltıcı etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu etkinin mekanizmasının anlaşılması için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

**Anahtar Kelimeler:** Alveolar kemik kaybı, bitki ekstreleri, oksidatif stres, periodontitis.



## ABSTRACT

### **The effects of systemic *Pistacia eurycarpa* Yalt. administration on alveolar bone loss and oxidative stress in rats with experimental periodontitis.**

**Aim:** In this study, it was aimed to investigate the effects of systemic administration of *P. eurycarpa* Yalt. plant extract on alveolar bone loss and biochemical parameters of gingival tissue in experimental periodontitis model on rats.

**Materials and Methods:** 32 Wistar-Albino rats weighing 200-250 g, were included in the study. Rats were divided equally into 4 groups (n=8): HC, EPC, EP400, EP800. Experimental periodontitis was induced by ligating method. Distilled water was administered to HC and EPC groups and plant extract was administered to EP400 and EP800 groups by oral gavage at doses of 400 mg/kg and 800 mg/kg, respectively. The rats were sacrificed on 15th day. GSH-Px, MDA, SOD, IL-1 $\beta$ , IL-10, TAS, TOS, OSI values in gingival tissues were analyzed by ELISA tests. Alveolar bone loss was examined on the micro-CT images of the maxilla.

**Results:** While the IL-1 $\beta$ , TOS, OSI values of the healthy control group were lower than the other groups, TAS values were higher (p<0.05). There was no significant difference in biochemical parameters between EPC, EP400 and EP800 groups (p>0.05). Alveolar bone loss significantly reduced in the intervention groups compared to the control group (p=0.001).

**Conclusion:** Within the limitations of this study, it was observed that systemic *P. eurycarpa* extract application reduced alveolar bone loss in an experimental periodontitis rat model. Additional studies are required to clarify the beneficial effects of *P. eurycarpa*.

**Keywords:** Alveolar bone loss, oxidative stress, periodontitis, plant extracts.

## SİMGELER VE KISALTMA DİZİNİ

ABTS: 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit

BHT: Bütillenmiş hidroksi toluen

CAL: Klinik ataşman seviyesi

CAT: Katalaz

CD14: Başkalaşım kümesi 14

CRP: C reaktif protein

DNA: Deoksiribo nükleik asit

DOS: Dişeti oluğu sıvısı

DP400: Deneysel periodontitis 400 mg/kg

DP800: Deneysel periodontitis 800 mg/kg

DPK: Deneysel periodontitis kontrol

ELISA: Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay

ETZ: Elektron transfer zinciri

FRAP: Demir iyonu indirgeyici antioksidan güç

GSH: Glutasyon

GSH-Px: Glutasyon Peroksidaz

Ig: İmmünoglobulin

IL: İnterlökin

IFN: İnterferon

JNK: c-Jun N-terminal kinaz

LFA-1: Lökosit fonksiton antijeni-1

LPO: Lipid peroksidasyon

MDA: Malondialdehit

MIC: Minimum inhibitör konsantrasyon

MMP-8: Matriks metalloproteinaz-8

MMP-9: Matriks metalloproteinaz-9

NADH: Nikotinamid adenin dinükleotit

NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat

NF-κB: Nükleer faktör kappa B

NK: Natural killer

NLRP: Nod benzeri reseptör proteini

NO: Nitrik oksit

OPG: Osteoprotegerin  
Ort: Ortalama  
OSI: Oksidatif stres indeksi  
PAMPs: Patojen ilişkili moleküler patern  
PD: Sondlama derinliği  
PDLF: Periodontal ligament fibroblastları  
Pg-LPS: *P. gingivalis* lipopolisakkarit  
PMNL: Polimorfonükleer lökosit  
PRRs: Patern tanıma reseptörleri  
RANK: Nükleer faktör kapp B reseptör aktivatörü  
RANKL: Nükleer faktör kapp B reseptör aktivatörü ligandı  
RNA: Ribonükleik asit  
ROT: Reaktif oksijen türleri  
SK: Sağlıklı kontrol  
SOD: Süperoksit Dismutaz  
SS: Standart sapma  
TAS: Total antioksidan seviye  
TGF: Transforme edici büyüme faktörü  
Th: Yardımcı T hücresi  
TNF: Tümör nekrotizan faktör  
TOS: Total oksidatif seviye  
Mikro-BT: Mikro bilgisayarlı tomografi

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1.	Deney akış şeması .....	34
Şekil 3.2.	Ağız açıklığının sağlanması .....	34
Şekil 3.3.	2. molar dişe ligatür uygulanması .....	35
Şekil 3.4.	a) Hassas terazi b) Vortex cihazı .....	37
Şekil 3.5.	-80° C derin dondurucu .....	37
Şekil 3.6.	Biyokimyasal analiz için kullanılan cihazlar .....	40
Şekil 3.7.	3 boyutlu düzlemde görüntülerin incelenmesi .....	41
Şekil 3.8.	Alveolar kemik kaybı ölçümlerinin yapılması .....	41
Şekil 4.1.	Dişeti dokusu IL1-β seviyeleri .....	44
Şekil 4.2.	Dişeti dokusu IL-10 seviyeleri .....	44
Şekil 4.3.	Dişeti dokusu GSH-Px seviyeleri .....	45
Şekil 4.4.	Dişeti dokusu MDA seviyeleri .....	45
Şekil 4.5.	Dişeti dokusu SOD seviyeleri .....	46
Şekil 4.6.	Dişeti dokusu TOS değerleri .....	47
Şekil 4.7.	Dişeti dokusu TAS değerleri .....	47
Şekil 4.8.	Dişeti dokusu OSI seviyeleri .....	47
Şekil 4.9.	Mikro-BT ORT-M seviyeleri .....	48
Şekil 4.10.	Mikro-BT ORT-D seviyeleri .....	49

## TABLULAR DİZİNİ

<b>Tablo 2.1.</b>	Periodontal hastalıklar 2017 sınıflandırması .....	11
<b>Tablo 2.2.</b>	Periodontitis evreleri.....	12
<b>Tablo 2.3.</b>	Periodontitis dereceleri .....	13
<b>Tablo 2.4.</b>	İnterlökin 1 sitokin ailesi isimlendirme ve fonksiyonları .....	16
<b>Tablo 2.5.</b>	Gerçek radikal ve reaktif oksijen türleri .....	17
<b>Tablo 2.6.</b>	Etki çeşitlerine göre antioksidanlar.....	24
<b>Tablo 2.7.</b>	Lokasyonlarına göre antioksidanlar.....	24
<b>Tablo 2.8.</b>	Kaynaklarına göre antioksidanlar .....	25
<b>Tablo 2.9.</b>	<i>P. eurycarpa</i> bitkisinin taksonomik hiyerarşisi .....	28
<b>Tablo 2.10.</b>	<i>P. eurycarpa</i> esansiyel yağının antimikrobiyal etkileri.....	28
<b>Tablo 2.11.</b>	Periodontal hastalık çalışmalarında hayvan modellerinin avantaj ve dezavantajları .....	31
<b>Tablo 3.1.</b>	<i>P. eurycarpa</i> esansiyel yağı gaz kromatografi-kütle spektrometri analizi .....	36
<b>Tablo 4.1.</b>	Gruplar arasında IL-1 $\beta$ ve IL-10 değerlerinin karşılaştırılması .....	43
<b>Tablo 4.2.</b>	Gruplar arasında GSH-Px, MDA, SOD değerlerinin Karşılaştırılması .....	45
<b>Tablo 4.3.</b>	Gruplar arasında TOS, TAS ve OSI değerlerinin karşılaştırılması .....	46
<b>Tablo 4.4.</b>	Mikro-BT üzerinde yapılan kemik kaybı ölçüm değerleri .....	48

# 1. GİRİŞ

Periodontitis, disbiyotik plak biyofilmi ile ilişkili ve diş destek dokularının yıkımı ile birlikte periodontal ataşmanın kaybıyla sonuçlanan kronik multifaktöriyel bir hastalıktır. Hastalık birincil olarak klinik ataşmanın kaybı, radyografik olarak gözlenen kemik kaybı, periodontal cep oluşumu ve dişeti kanaması ile ortaya çıkmaktadır (1). Konak yanıtı proteinazları aktive ederek marjinal periodontal ligament liflerinin yıkımına, birleşim epitelinin apikale migrasyonuna ve bakteri biyofilminin kök yüzeyi boyunca apikale doğru yayılmasına neden olmaktadır. Bakteriyel biyofilmin formasyonu dişetinde enflamasyonu başlatmaktadır. Fakat periodontitisin başlaması ve ilerlemesi dokudaki disbiyotik ekolojik değişikliklere bağlıdır. Bu değişiklikler enflamasyon ve doku yıkım ürünleri ile birlikte bazı bakteri türlerinin baskın gelmesi ve dokudaki antibakteriyel mekanizmalar nedeniyle olmaktadır (2). Periodontitis diş kaybına, çiğneme fonksiyonunun bozulmasına ve beslenmenin zayıflamasına neden olmaktadır. Dişteki ve destek dokulardaki kayıplar nedeniyle konuşmanın bozulmasına ve yaşam kalitesinin düşmesine neden olan periodontitis, ülkelerin ekonomisi için de büyük bir yük haline gelmektedir. Birleşik Krallık'ta yapılan bir incelemeye göre 2008 yılında periodontitis ile ilişkili harcamaların 4,6 milyar dolar seviyesine ulaştığı tespit edilmiştir (3).

Periodontitis hastalığının ilerleme hızı bakteriler ve immün sistem hücreleri arasındaki kompleks etkileşime bağlıdır. İmmün yanıtı düzenleyen kompleks sitokin ağı pro-enflamatuvar sitokinler, anti-enflamatuvar sitokinler ve spesifik sitokin reseptörlerini içermektedir. Sitokinler diğer kronik hastalıklarda olduğu gibi periodontitis hastalığının da başlangıcında ve ilerlemesinde ve hastalığa karşı konak yanıtın düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır (4). Enflamatuvar sitokinlerden olan interlökin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) seviyelerinin periodontal hastalık ile artış gösterdiği ve tedavi ile birlikte anlamlı derecede azaldığını gösterilmiştir. Aynı zamanda anti-enflamatuvar sitokinlerden olan IL-10 ise periodontal hastalık olmayan bölgelerde daha yüksek seviyelerde bulunurken, periodontal tedavi ile birlikte hastalıklı bölgelerde de artış göstermektedir (5,6).

Reaktif oksijen türleri (ROT) çeşitli hücresel süreçte yer alan önemli sinyal molekülleridir. Bu moleküller moleküler oksijenden meydana gelirler ve antioksidan mekanizmalar tarafından nötr hale dönüştürülmedikleri takdirde hücre hasarına (hücre

içi proteinler, lipidler ve deoksiribo nükleik asit (DNA)) neden olmaktadır. Bu moleküllerin üretimi patojen mikroorganizma, travma, yanık gibi çeşitli tehlikeler karşısında konak yanıtının önemli bir parçasıdır (7). Son yıllarda oksidatif stresin periodontitis patogenezinde önemli bir etken olduğuna yönelik güçlü kanıtlar ortaya çıkmıştır. ROT düşük seviyelerde kültür ortamındaki fibroblastları ve epitel hücreleri stimüle edebilmektedir, fakat yüksek seviyelerde bulunmaları oksidatif hasara neden olabilmektedir. Oksidatif hasar genellikle yüksek konsantrasyonda ROT'a maruz kaldığında veya antioksidan defans mekanizmalarında azalma olduğunda gerçekleşmektedir. Periodontal hastalığın ise düşmüş total antioksidan kapasite ve artmış oksidatif hasar ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (8,9).

Sağlıklı bir metabolizmada bulunan antioksidan mekanizmalar antioksidan enzimler (Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), glutasyon transferaz, glutasyon redüktaz, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT)), vitaminler (A, E ve C vitamini) ve organik/inorganik moleküllerdir (Melatonin, Glutasyon, Selenyum) (10).

Oksidatif hasar ile birlikte genom, proteinler, yapısal karbonhidratlar ve lipidlerde oksidatif değişiklikler gerçekleşmektedir. Hücrelerde oksidatif hasar ile birlikte lipid peroksidasyonu (LPO) meydana gelmektedir. LPO biyolojik sistemlerde enzimatik kontrol ile meydana gelebilen serbest radikaller ile ilişkili bir süreçtir. Bu süreçte çeşitli aldehitler oluşmaktadır. Bu aldehitlerden malondialdehit (MDA) lipid peroksidasyonun ve aynı zamanda oksidatif stresin önemli bir göstergesidir (11).

Periodontitisin önlenmesi ve tedavisinde etkili olabilecek ilaçlar birçok araştırmanın konusu olmuştur. Ayrıca antioksidan ve anti-enflamatuvar özellikleri olan bitki ekstreleri de bu amaçla araştırılmış olup periodontitis karşısında etkili sonuçlar veren çalışmalar mevcuttur (12,13). *Pistacia* cinsi bitkilerin çeşitli bölümlerinden elde edilen ekstreler ile yapılan çalışmalarda antioksidan, antimikrobiyal ve anti-enflamatuvar etkinlikleri tespit edilmiştir (14–17). *Pistacia eurycarpa* bitkisi ile yapılan çalışmalarda, *P. eurycarpa* bitki ekstresinin periodontitisin ana patojenlerinden olan *P. gingivalis* karşısında bakterisit etki gösterdiği ve periodontitise karşı koruyucu etkisi olduğu rapor edilmiştir (18,19).

Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızın amacı *P. eurycarpa* bitki ekstresinin Wistar albino ratlarda oluşturulan deneysel periodontitis modelinde alveolar kemik kaybı ve dişeti dokusu biyokimyasal parametreleri üzerine etkisini incelemektir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Periodontal Hastalık

Periodontal hastalıklar diş destek dokularında hasara ve yıkıma neden olan dünya genelinde birçok insanı etkileyen bir hastalık grubudur. Gingivitis bu hastalıkların en hafif formudur. Diş üzerinde biriken bakteriyel biyofilm gingivitis gelişimine neden olmaktadır. Fakat gingivitis diş destek dokularında yıkıma neden olmadığı için etkisi geri dönüşümlüdür (20).

Periodontitis bazı spesifik mikroorganizmaların sebep olduğu diş destek dokularının kaybına neden olan enflamatuvar bir hastalıktır. Periodontal ligament ve alveolar kemiğin yıkımı ile birlikte cep oluşumu, dişeti çekilmesi gözlenebildiği gibi, bu iki durum bir arada da gözlenebilmektedir. Periodontitisi gingivitisten ayıran temel özellik, klinik olarak da tespit edilebilen periodontal yıkım sonucunda oluşan ataşman kaybıdır (21,22). Periodontitis patogenezi için bakteriyel biyofilm tek başına yeterli olmayabilir. Hastalık, bakteriyel biyofilm ile konak arasındaki denge konağın aşırı immün yanıtı sonucunda bozulduğunda meydana gelmektedir (23).

#### 2.1.1. Gingivitis ve Periodontitisin Histolojik Aşamaları

Gingivitis gelişimi klinik olarak gözlenebilmektedir. Dokulardaki bu değişiklikler mikroskop altında da net olarak incelenebilmektedir. Genel olarak bakıldığında nötrofil, makrofaj, lenfosit ve plazma hücrelerinin bağ dokuya infiltrasyonu izlenmektedir. Bu savunma hücrelerinin ve salgıladıkları yıkıcı enzimlerin akümülyasyonu sonucu sağlıklı bağ dokusu yapısı bozulmakta ve bu durum kollajen azalmasına ve beraberinde birleşim epitelinin proliferasyonuna neden olmaktadır. Vazodilatasyon ve artmış vasküler geçirgenlik sonucu intraselüler sıvı ile birlikte savunma hücreleri dokuya geçerek eritem ve ödem oluşmasına neden olmaktadır. Oral hijyen geliştirilerek bakteriyel yük azaltılır ise bu değişiklikler geri dönüşümlüdür (21).

Dişeti dokusunda meydana gelen değişiklikler başlangıç lezyonu, erken lezyon, yerleşik lezyon ve ilerlemiş lezyon olarak aşamalara ayrılmaktadır (24).

- **Başlangıç Lezyonu:** Başlangıç lezyonu plak akümülyasyonunun 2 ile 4. günü aralığında oluşmaktadır. Fakat bu durum klinik olarak gözlenemeyebilir. Çünkü devamlı olarak bulunan subgingival biyofilm dişeti dokusunda düşük derecede kronik enflamatuvar yanıtı neden olmaktadır. Diğer bir deyimle başlangıç lezyonu histolojik olarak tespit edilebilmektedir, fakat bu aşamada klinik görüntü sağlıklı olarak



izlenmektedir. Düşük dereceli enflamasyonda vasküler geçirgenlik artmaktadır ve böylece nötrofil ve monositler dişeti vasküler yapısından kimyasal uyarıların kaynağına doğru göç etmektedir. Adhezyon molekülü 1 ve E-selektin gibi adhezyon moleküllerinin up-regülasyonu nötrofillerin kapiller damarlardan bağ dokusuna geçişini kolaylaştırmaktadır. Sıvıların damarlardan dokulara geçişi yerel mikrodolaşımdaki hidrostatik basıncı arttırmakta ve dişeti oluğu sıvısı (DOS) akış hızı artmaktadır. DOS akış hızının artması bakteriyel ürünleri seyreltmekte ve potansiyel olarak sulkustaki bakteri ve bakteri ürünlerinin temizlenmesinde rol oynayabilmektedir. Fakat bakteriyel biyofilmlerin doğası düşünüldüğünde bu temizleme mekanizması sadece planktonik (serbest dolaşan) bakterileri sulkustan uzaklaştırabilir (21).

- **Erken Lezyon:** Erken lezyon devam eden plak akümülyasyonunun 1. haftasında gelişmekte ve klinik olarak gingivitisin erken bulgularını göstermektedir. Kapiller damarların proliferasyonu ve devam eden vazodilatasyon nedeniyle dişeti eritematöz bir görüntüdedir (25). Artmış vasküler geçirgenlik DOS akışına neden olmaktadır ve göç eden nötrofil sayısı anlamlı derecede artış göstermektedir. Baskın olan hücre türleri nötrofil ve lenfositlerdir. Nötrofiller dokulardan sulkusa göç etmekte ve bakterileri fagositoza uğratmaktadır. Fibroblastlar primer olarak apoptoz yoluyla dejenerasyona uğramaktadır ve bu lökosit infiltrasyonu için alan sağlamaktadır. Birleşim epitel ve sulkuler epitelin lateral ve apikal bölgelerinde gerçekleşen kollajen yıkımı nedeniyle kollajen miktarında azalma gözlenmektedir. Bu epitel yapıların bazal hücreleri bakteri ve bakteri ürünlerine bariyer oluşturmak amacıyla bağ dokusunun kollajen miktarı azalan bölgelerine migrasyona uğramaktadır (21,26). Ödemin sonucu olarak dişetinde şişkinlik oluşmaktadır. Buna bağlı olarak da sulkus derinliğinde artış gözlenmektedir. Subgingival biyofilm bu durumdan yararlanarak apikale prolifer olmakta ve plak kontrolünün zorlaşmasına neden olmaktadır. Erken lezyon ısrarcı bir şekilde devam edebilmekte veya daha ileri tablolara doğru ilerleme gösterebilmektedir (21).

- **Yerleşik Lezyon:** Yerleşik lezyon klinik olarak kronik gingivitis tablosuna karşılık gelmektedir. Erken lezyondan yerleşik lezyona geçiş birçok faktöre bağlı olabilmektedir. Biyofilmin içeriği ve miktarı, konak duyarlılığı ve lokal ve sistemik risk faktörleri bunlardan bazılarıdır. Yerleşik lezyonda plazma hücreleri baskındır ve enflamatuvar hücreler bağ dokusunda yoğun bir şekilde bulunmaktadır. Enflamatuvar hücreler birleşim epitel ve sulkuler epitele komşu olan bölgelerde,

damarların çevrelerinde ve kollajen liflerinin aralarında bulunmaktadır. Kollajen yıkımı ile epitelyumun bağ dokusuna göçü ilerleme göstermektedir. Dokularda biriken nötrofiller fagosite edilemeyen bakterilerin öldürülmesi için lizozomal içeriklerini ekstraselüler alana salgılayarak doku yıkımının artmasına neden olmaktadır. Nötrofiller aynı zamanda matriks metalloproteinaz-8 (MMP-8, nötrofil kollajenaz) ve matriks metalloproteinaz-9'un (MMP-9, jelatinaz B) da ana kaynaklarıdır. Kollajen liflerinin arasına yoğun miktarda yerleşen nötrofiller MMP-8 ve MMP-9 salgılayarak kollajen yıkımının artmasına neden olmaktadır. Birleşim epiteli ve sulkuler epitel dış yüzeyine sıkı yapışma özelliğine sahip olmayan cep epiteline dönüşmeye başlamaktadır. Bu doku yoğun miktarda nötrofil barındırmaktadır ve geçirgenliğin artmasıyla alttaki bağ dokusuna ürünlerin girmesi veya çıkması kolaylaşmaktadır. Cep epiteli ülsere olabilmekte ve periodontal sondun geçişine daha az direnç gösterebilmektedir. Bundan dolayı sondlamada kanama kronik gingivitiste sık görülen bir özelliktir. Plak kontrolü sağlanır ise bu enflamatuvar değişiklikler hala geri dönebilmektedir (21).

- **İlerlemiş Lezyon:** İlerlemiş lezyon gingivitisten periodontitise geçişi göstermektedir. Bakteriye yük, konak enflamatuvar yanıtı, çevresel ve genetik risk faktörleri bu geçişte karar verici faktörlerdir. Histolojik incelemelerde kollajen yıkımının periodontal ligamente ve alveolar kemiğe ulaştığı gözlenmektedir. Cep epiteli ve periodontal cepte nötrofiller baskındır, bağ dokusunda ise plazma hücreleri baskındır. Birleşim epiteli intakt bir epitelyal bariyeri sağlayabilmek için kök yüzeyi boyunca apikale doğru kollajen yıkımı gerçekleşen bölgelere migrasyona uğramaktadır. Osteoklastik kemik yıkımı başlamakta ve kemik dokusu, bakterilerin kemik dokusuna yayılmasını önlemek amacıyla çekilme göstermektedir. Cep derinleştikçe plak bakterileri de apikale doğru ilerlemektedir. Bu durum periodontal patojen olarak değerlendirilen birçok bakteri türü için uygun ortam oluşmasına neden olmaktadır. Cep, bakteriler için hazır besin içeren, sıcak, nemli ve anaerobik bir ortamdır. Bakteriler aktif olarak doku dışında olduğu için enflamatuvar yanıt bakterilerin eliminasyonunda anlamlı bir etki oluşturmaz. Bu nedenle kronik enflamasyon ve buna bağlı doku yıkımının görüldüğü bir döngü gelişmektedir. Periodontal ligamentteki kollajen yıkımı devam etmekte, kemik rezorpsiyonu ilerlemekte, birleşim epiteli sağlam bir bariyer yapısı oluşturmak için apikale migrasyona devam etmekte ve bunların sonucu olarak cep derinliği de artmaya devam etmektedir. Oral hijyen yöntemleri ile bakterinin

uzaklaştırılması ve biyofilmin bozulması daha da zorlaşmaktadır. Bundan dolayı bu yıkım döngüsü kalıcılık göstermektedir (21).

### 2.1.2. Periodontitis Etiyolojisi

Dental plakta biyofilm formunda bulunan mikroorganizmalar periodontal hastalıkların primer etiyolojik ajanları olarak kabul edilmektedir. Biyofilmler yüzeylere ve birbirlerine yapışabilen bakteriyel topluluklardır. Biyoloji ve teknolojiye gelişmeler dental biyofilmlerin araştırılması için gelişmiş ve spesifik araçların kullanılmasına imkan tanımıştır (27). GasPak sistemi (28) ve anaerobik kabinlerin (29) geliştirilmesi ağız içindeki zor üreyen anaerobik planktonik türler keşfedilmiştir (30). Anaerobik türlerin tespiti için ortaya çıkan bu gelişmeler sayesinde periodontitisin başlangıcı ve gelişmesi ile belli bakteri türlerinin ilişkilendirilmesi sağlanmıştır. Fakat dental plak biyofilmlerinin formasyonu, olgunlaşması ve ekolojisi hakkında asıl detaylı bilgileri DNA temelli analizler, polimeraz zincir reaksiyonu ve konfokal mikroskopi gibi gelişmeler sağlamıştır (31–34).

Ağız epitel tabakası ve ağızdaki diş yüzeyleri oral biyofilmlerin yapışabildikleri yüzeylerdir. Oral bakteriler ilk olarak doğumda veya hayatın ileri aşamalarında enfekte aile bireylerinden geçmektedir (35). Bakterinin başarılı bir kolonizasyon sağlaması doku türü, konum ve eksternal kuvvetlere açıklık faktörlerinden önemli derecede etkilenmektedir. Gingival sulkus, özellikle interdental papiller arasındaki köprüyü oluşturan col bölgesi bakterilerin yerleşmesi için korunaklı bir ortam sağlamaktadır. İlk kolonizasyonda *Streptokok*, *Veillonella*, *Prevotella*, *Neisseria*, *Gemella*, *Actinomyces* türleri bulunmaktadır (36). Biyofilm olgunlaşması sırasında bakteriler kendi türleri ve diğer türler arasında yüzey ilişkili yapılar aracılığıyla etkileşime girmektedir. Sofistike bir ekolojik sistemin bir parçası olarak biyofilmdeki bakteriler, genetik bilginin aktarılması ve popülasyon yoğunluğuna bağlı olarak gen ekspresyon koordinasyonunu sağlayabilen quorum sensing mekanizmaları ile iletişim içinde olmaktadır (37,38). Bunlara ek olarak biyofilm bakterileri, kendilerini konaktan ve zor çevresel koşullardan korumak için besin alımını düzenleme, gelişimi yavaşlatma ve diğer türlerden korunmak için bakteriosin üretme gibi mekanizmaları da kullanmaktadır (39).

Olgun dental biyofilmler geniş çeşitlilikte bakteri içerebilmektedir. Oral kavitedeki mikrofloranın moleküler tespitine göre yaklaşık 700 çeşit bakteri türü bulunmaktadır (27). Bu türlerin 50-60 tanesi plak örneğinde 16S rRNA problrarı kullanılarak tespit edilebilmiştir (40). Bakterilerin ilk kolonizasyonu, biyofilmin

olgunlaşması ve potansiyel patojen olan supra ve subgingival toplulukların oluşması sürecinde dental biyofilm birkaç aşamadan geçmektedir. Bu aşamalar kolonizasyon, kommensal bakterilerin gelişmesi, patojenik türlerin integrasyonu ve işgali olarak sayılabilir (41). Periodontal olarak sağlıklı bir bireyde gingival sulkustaki olgun biyofilmlerin yapısı stabil olarak izlenmektedir. Buna karşılık klinik durum sağlıklıdan hastalıklıya veya aksi yönde değiştiğinde birçok bakteri türü yok olmakta veya ortaya çıkmaktadır (42,43). Periodontal hastalıklar fırsatçı polimikrobiyal enfeksiyonlar olarak değerlendirilmektedir. Subgingival biyofilmde periodontitis ile ilişkili olduğu varsayılan bakteriler bulunmaktadır. Bunlar, *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Eikenella corrodens*, *Campylobacter rectus*, *Parvimonas micra* ve *Streptococcus intermedius* olarak sayılabilir. *P. gingivalis*, *T. forsythia* ve *T. denticola* kırmızı kompleks bakterileri olarak tanımlanmakta ve bu bakteriler kronik periodontitisin ilerlemesinden sorumlu tutulmaktadır (44). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ise periodontitisin agresif formundan sorumlu tutulmaktadır. Oral kavite bu bakterinin bilinen tek habitatıdır. Çocuklarda veya periodontal patolojinin yokluğunda bile çeşitli oral mukoza yüzeylerinden izole edilebilmektedir (45).

### 2.1.3. Periodontal Hastalık Patogenezi

Gingival ve periodontal lezyonlar karakteristik olarak biyofilm tarafından oluşturulmaktadır fakat, doğal ve edinilmiş bağışıklık da bu lezyonların gelişmesinde rol oynamaktadır. Dişeti sınırları içerisinde kalan enflamasyon biyofilm ve konak doku arasında bir dengenin varlığını göstermektedir. Periodontitis ise bu simbiyozun bozulmasının sonucunda gelişmektedir (27).

Dental plak biyofilmleri altlarındaki doku ile sürekli etkileşim içerisinde. Bu dokular diş yüzeyi, birleşim epiteli, dişeti epiteli ve cep epiteli olabilir. Bakteriyel biyofilm tükürük, dişeti oluğu sıvısı, hücre debrisleri ve yemeklerden beslenebilmektedir. Biyofilmleri zararlı, konağa hiç faydası olmayan yapılar olarak düşünmek yanlıştır. Biyofilmler konağı etkiler fakat aynı şekilde konak yanıtı, biyofilmlerin metabolizmalarını ve içeriklerini değiştirebilmektedir. Sağlıklı bir kişide biyofilm ve konak defansı karşılıklı fayda sağlayan simbiyotik bir ilişki içindedir (46,47).

Dental biyofilmlerden sürekli olarak bakteri salınmakta ve bunların büyük bir bölümü herhangi bir konak yanıtı ile karşılaşmadan elimine olmaktadır. Klinik olarak

sağlıklı periodontal dokularda anlamlı bir bakteriyel istila gözlenmez. Doku bütünlüğünü sağlamada çeşitli mekanizmalar görev almaktadır. Devamlı tükürük akışı bakteriyel ürünleri uzaklaştırmakta, dişeti oluğu sıvısı gingival sulkusu temizlemekte ve gingival epitel ve birleşim epitelinin yüksek turnover özellikleri bakteri yüklü yüzeysel hücreleri elimine etmektedir (48).

Mekanik temizleme mekanizmalarına ek olarak birincil antimikrobiyal savunma sistemleri yabancı türleri algılayıp yok edebilmektedir. Bu sistemler, tükürükteki peptidler, nötrofiller ve kalıp tanıma reseptörleri (PRRs: patern tanıma reseptörleri) olarak sayılabilir (49,50).  $\alpha$ -defensinler ilişkide oldukları polimorfonükleer lökositler ile birlikte birleşim epitelinde izlenmektedir. Bu hücreler birleşim ve sulkus epitelinden salgılanan interlökin 8 (IL-8) türevi bir sitokine yanıt olarak sürekli olarak sulkusa doğru göç etmektedir (51).  $\beta$ -defensinler ise temel olarak salgılandıkları gingival epitelde ve cep epitelinde bulunmaktadır (52). Yüksek antibakteriyel özellikleri yanında defensinler, kompleman sistemini aktive edebilmekte, epitel hücrelerinde IL-8 salgılanmasını arttırabilmekte ve savunma hücrelerini ortama çekebilmektedir (53). PRRs tipik olarak polimorfonükleer lökositler, makrofajlar, dendritik hücreler, endotelial hücreler, mukozal epitel hücreleri ve lenfositlerde bulunmaktadır. Endositotik PRRs fagositlerin yüzeylerinde bulunmakta ve mikroorganizmalara yapışmayı sağlayarak mikroorganizmaların çevrelenmesi ve yok edilmesinde görev almaktadır. Sinyal üreten PRRs ise daha çok çeşitte hücre yüzeyinde bulunmaktadır. Bu reseptörler mikroorganizmalardaki yapısal olarak korunmuş patojen ilişkili moleküler kalıpları (PAMPs: pathogen-ilişkili moleküler patern) tanımaktadır. PAMPs ile PRRs arasındaki bağlantının gerçekleşmesi ile birlikte sitokinler gibi intraselüler düzenleyici moleküllerin sentezi ve salgılanması sağlanmaktadır. Bu moleküller ise doğal ve kazanılmış bağışıklığın aktive edilmesi için kritik öneme sahiptir (27,54).

PRRs sinyal ailesinin alt grubu olan toll-like reseptörler de periodontal dokuda gözlenmiştir (55). PRRs ile PAMP arasındaki etkileşim bir olaylar zincirine neden olmaktadır. Toll-like reseptörler ve nükleer faktör kappa B'nin (NF- $\kappa$ B) aktive olması ile reaktif oksijen türleri, sitokinler (IL-1, IL-12 ve TNF $\alpha$ ) ve kemokinler (IL-8) sentez edilmektedir. Bu bileşenler ani bir enflamatuvar yanıtı neden olmakta ve yeni lökositlerin migrasyonunu sağlamaktadır. CD14 (başkalaşım kümesi 14) ise polimorfonükleer lökositlerden, makrofajlardan ve monositlerden salgılanabilen PRRs ailesine ait bir başka moleküldür. Bu molekül toll-like reseptör 4'ün lipopolisakkarite

olan yanıtını güçlendirmektedir. CD14, lipopolisakkarit ve toll-like reseptör 4 sitokinlerin ve kemokinlerin üretimini arttırarak kompleman sistemini ve koagülasyon mekanizmasını aktive etmektedir. Son olarak toll-like reseptörler dendritik hücrelerin spesifik T hücre yanıtını başlatmasını sağlamaktadır (56).

Artmış vasküler geçirgenlik ve serum protein sistemlerinin aktivasyonu lokal akut enflamatuvar yanıtı arttırmaktadır. Gingival sulkus sıvısında artış gözlenmektedir (57). Lezyon gelişiminin erken aşamalarında dişeti dokusunun biyofilme komşu bölgesinde polimorfonükleer lökositler (PMNL) yoğun olarak bulunmaktadır. PMNL'ler potansiyel patojenleri yok edebilmek için proteazlar, prostaglandinler ve reaktif oksijen molekülleri salgılamaktadır. Bu salgılanan moleküller konak ve bakteri ayrımı yapamadıkları için dişeti bağ dokusunda da hasara neden olmaktadır. Başarılı bir enflamatuvar yanıt enfeksiyöz ajanı elimine etmekte ve doku onarımını başlatmaktadır. Fakat enfeksiyon inatçı bir şekilde devam ederse makrofaj ve dendritik hücrelerin etkisi ile edinilmiş bağışıklık devreye girmekte ve lezyon kronikleşmeye başlamaktadır. T ve B hücreleri birikmeye başlamakta ve lezyonda baskın hale gelmektedir. Antijen nedeniyle ortaya çıkan immün yanıtın tipine ve düzenleyici sitokinlerin varlığına göre bu hücrelerin oranları değişiklik göstermektedir. B hücrelerinden gelişen plazma hücreleri bakteriyel antijenlere karşı antikor üretmektedir. Tipik bir dişeti lezyonunda T hücreleri baskındır. Sitokinlerin miktarına ve tiplerine göre T-helper hücreleri (Th1 veya Th2) gelişmektedir. Periodontal hastalığın immün regülasyonu açısından baskın olan T helper hücre çeşidi önemlidir (58). Stabil periodontal lezyonla Th1 hücreleri baskındır. Güçlü Th2 varlığı, predominant plazma hücreleri ile birlikte lezyon gelişimine yönelik eğilimi arttırmaktadır (59).

Alveolar kemik rezorpsiyonu birçok periodontal hastalık için tanımlayıcı özelliktedir. Birkaç enflamatuvar yolak kemik yıkımına neden olabilir. Makrofajlar spesifik immün yanıt için antijenleri tanıtmak dışında, kemik rezorpsiyonuna neden olan sitokin ve enzimleri üretmektedir. Tümör nekroz faktör reseptör ailesinde bulunan NFκB reseptör aktivatörü (RANK), NFκB ligandı reseptör aktivatörü (RANKL) ve osteoprotegerini (OPG) içeren alternatif bir mekanizma da tanımlanmaktadır (60,61). RANKL ligandı osteoblastlarda bulunmaktadır, fakat aynı zamanda lenfositler tarafından da salgılanabilmektedir. RANK ise olgun osteoklastlar ve bunların öncüleri tarafından ve osteoprotegerin ise mezenkimal hücreler tarafından salgılanabilmektedir. RANK ve RANKL etkileşimi kemik rezorpsiyonuna neden olan osteoklastların

farklılaşmasına ve aktivasyonuna neden olmaktadır. Bu etkileşim osteoprotegerin tarafından inhibe edilebilmektedir. RANKL ve osteoprotegerin dişeti oluğu sıvısında bulunmakta ve birbirlerine karşı göreceli seviyeleri hastalığı tahmin etmekte kullanılabilir (62).

Dental plak içeriğindeki mikroorganizmalar gingivitis ve peridontitisin başlamasına ve devam etmesine neden olmaktadır. Mikrobiyal biyofilm geniş bir şekilde incelenmiş ve bir kişide yaklaşık 150 türün bulunduğu belirlenmiştir. Ayrıca dental plakta şimdiye kadar 800 farklı tür tespit edilmiştir (63). Hastalığa özellikle sebep olan türlerin hangileri olduğuna yönelik tartışmalar hala devam etmektedir. Bu konuda gram negatif anaerobik bakterilerin, spiroketlerin ve hatta virüslerin hastalıkta etkili olduğu düşünülmektedir, fakat herhangi bir patojenin tek başına etken olmasındansa disbiyoz (mikrobiyal biyofilmin düzensizliği) patojenik bir ünite olarak kabul edilmektedir (64).

Mikrobiyal biyofilm ile konak arasındaki dengenin bozulması açıklanması zor bir mekanizmadır. Çünkü hem mikrobiyal biyofilm hem de konağın genetik ve immün sistem profilleri çok büyük değişkenlikler gösterebilmektedir (64,65).

Epitelyal hücreler patojenlere karşı fiziksel bir bariyer görevi görmekte ve doğal ve edinilmiş bağışıklık yanıtlarını ortaya çıkarmaktadır (65). Epitelyumdaki dendritik langerhans hücreleri mikrobiyal antijenik materyali lenfositlere sunmaktadır. Bununla birlikte periodontal dokuya nötrofil, granülosit ve lenfosit infiltrasyonu başlamaktadır. Nötrofiller bakterileri çevreleyip öldürmeyi amaçlamakta, fakat mikrobiyal biyofilmin boyutu ve kronik direnci karşısında yetersiz kalmaktadır. Bu ağır kronik enflamatuvar yanıt osteoklastlar tarafından alveolar kemiğin yıkımına, matrix metalloproteinazlar tarafından periodontal ligamentin yıkımına ve granülasyon dokusunun formasyonuna neden olmaktadır. Bu patofizyolojik durum dişin kaybına veya terapötik olarak granülasyon dokusunun ve de mikrobiyal biyofilmin elimine edilmesine kadar devam etmektedir (66,67).

Lenfositler hasarlı bölgeye geldiklerinde, B hücreleri antikor üreten plazma hücrelerine dönüşmektedir. Antikorların miktarı ve etkinliği periodontitis karşısında koruma için önemlidir. Antikor yanıtının yanında T hücreleri T-helper hücrelerini uyararak hücre kaynaklı immün yanıtın oluşmasına da katkıda bulunmaktadır.

#### 2.1.4. Periodontal Hastalıkların Sınıflandırması

Periodontal hastalıklar Avrupa Periodontoloji Federasyonu ve Amerika Periodontoloji Akademisi ortak çalışmasında 1999 yılındaki periodontal hastalık sınıflaması, 'Periodontal ve peri-implant hastalıklar ve durumların sınıflaması 2017' başlığı ile hazırlanan sınıflama ile değiştirilmiştir (Tablo 2.1). Bu sınıflamada periodontitis evrelere ve derecelere göre sınıflandırılmıştır (Tablo 2.2, Tablo 2.3)(1).

**Tablo 2.1.** Periodontal hastalıklar 2017 sınıflandırması (1,68)

<b>Periodontal Sağlık, Gingival Hastalıklar ve Durumlar</b>
Periodontal ve Gingival Sağlık <ul style="list-style-type: none"><li>• Bütünlüğü Bozulmamış Periodonsiyumda Periodontal Sağlık</li><li>• Azalmış Periodonsiyumda Periodontal Sağlık<ul style="list-style-type: none"><li>a) Stabil Periodontitis Hastası</li><li>b) Periodontitis Olmayan Hasta</li></ul></li></ul>
Gingivitis: Dental Biyofilm Kaynaklı <ul style="list-style-type: none"><li>• Sadece Dental Biyofilm Kaynaklı</li><li>• Sistemik ve Lokal Risk Faktörleri Tarafından Modifiye Edilen</li><li>• İlaça Bağlı Dişeti Büyümeleri</li></ul>
Gingival Hastalıklar ve Durumlar: Dental Biyofilm Kaynaklı Olmayan <ul style="list-style-type: none"><li>• Genetik/Gelişimsel Bozukluklar</li><li>• Spesifik Enfeksiyonlar</li><li>• Enflamatuvar ve İmmünite Durumları</li><li>• Reaktif Süreçler</li><li>• Neoplazmlar</li><li>• Endokrin, Beslenme Bozuklukları ve Metabolik Bozukluklar</li><li>• Travmatik Lezyonlar</li><li>• Gingival Pigmentasyon</li></ul>
<b>Periodontitis</b>
Nekrotizan Periodontal Hastalıklar
Sistemik Hastalıkların Belirtisi Olarak Periodontitis
Periodontitis <ul style="list-style-type: none"><li>• Evreler<ul style="list-style-type: none"><li>a) Evre I: Başlangıç Periodontitis</li><li>b) Evre II: Orta Periodontitis</li><li>c) Evre III: Ek Diş Kaybı İhtimali Bulunan İlerlemiş Periodontitis</li><li>d) Evre IV: Dentisyon Kaybı İhtimali Bulunan İlerlemiş Periodontitis</li></ul></li><li>• Dereceler<ul style="list-style-type: none"><li>a) Derece A: Yavaş İlerleyen</li><li>b) Derece B: Orta Hızda İlerleyen</li><li>c) Derece C: Hızlı İlerleyen</li></ul></li></ul>



Periodonsiyumu Etkileyen Diğer Durumlar
Periodontal Destek Dokuları Etkileyen Sistemik Hastalık ve Durumlar
Diğer Periodontal Durumlar <ul style="list-style-type: none"> <li>• Periodontal Apseler</li> <li>• Endodontik-Periodontal Lezyonlar</li> </ul>
Mukogingival Bozukluklar ve Durumlar
Travmatik Oklüzal Kuvvetler <ul style="list-style-type: none"> <li>• Primer Oklüzal Travma</li> <li>• Sekonder Oklüzal Travma</li> <li>• Ortodontik Kuvvetler</li> </ul>
Diş ve Protez Kaynaklı Faktörler

**Tablo 2.2.** Periodontitis evreleri (2)

Periodontitis evresi	Evre I	Evre II	Evre III	Evre IV	
Şiddet	İnterdental CAL	1-2 mm	3-4 mm	≥ 5 mm	≥ 5 mm
	Radyografik kemik kaybı	Koronal üçlü (<% 15)	Koronal üçlü (% 15-33)	Orta veya apikal üçlüye ulaşan	Orta veya apikal üçlüye ulaşan
	Diş kaybı	Periodontitis nedenli diş kaybı yok		Periodontitis nedeniyle kaybedilen diş sayısı ≤ 4	Periodontitis nedeniyle kaybedilen diş sayısı ≥ 5
Tedavinin Karmaşıklık Seviyesi		PD ≤ 4 mm Horizontal destek doku kaybı	PD ≤ 5 mm Horizontal destek doku kaybı	Evre II'ye ek olarak: PD ≥ 6 mm, Vertikal kemik kaybı ≥ 3 mm, Sınıf II veya III furkasyon lezyonu, Orta derece kret defekti	Evre III'e ek olarak: Çiğneme fonksiyonunda bozukluk, Sekonder oklüzal travma (≥2. derece mobilite), İleri derece kret defekti, Posterior diş kaybı nedeniyle kapanışta çökme, dişlerde kayma, şiddetli enflamasyon, kalan diş sayısı < 20 Yukarıdaki nedenlerle kompleks rehabilitasyon ihtiyacı
	Yerel özellikler				
Yaygınlık	Evreye tanımlayıcı olarak eklenir	Lokalize (etkilenen diş oranı <% 30 / Tutulumu Her evrede	Yaygın / Molar-Keser		

CAL: klinik ataşman seviyesi, PD: sondlama derinliği

**Tablo 2.3.** Periodontitis dereceleri (2)

Periodontitis Derecesi		Derece A	Derece B	Derece C	
<b>Primer Kriter</b>	Hastalığın ilerlemesinin direk kanıtı	Takip verisi (radyografik kemik kaybı veya CAL)	5 yıl kayıp yok	5 yılda 2 mm'den az kayıp	5 yılda 2 mm üzerinde kayıp
		% kemik kaybı / Yas	< 0.25	0.25 – 1.0	> 1.0
<b>Dereceyi Düzenleyen Faktörler</b>	Hastalığın ilerlemesinin indirek kanıtı	Vaka Fenotipi	Fazla miktarda plak ile birlikte düşük seviye yıkım	Plak miktarı ve yıkım orantılı	Plak miktarı ve yıkım orantısız (molar/keser tutulumu)
	Risk Faktörleri	Sigara Diyabet	Sigara kullanımı yok Diyabet tanısı yok	Günde 10'dan az sigara Diyabet hastası hbA1c < 7.0	Günde 10'dan fazla sigara Diyabet hastası HbA1c ≥ 7.0
<b>Periodontitisin Sistemik Etki Riski</b>	Enflamatuvar Yük	Yüksek duyarlı CRP (hs-CRP)	< 1 mg/L	1-3 mg/L	> 3 mg/L

CRP: C reaktif protein

## 2.2. Sitokinler

Sitokinler etki ettikleri hücreler üzerinde belirli bir tepkiyi ortaya çıkaran, spesifik hücrelerden salgılanan biyolojik olarak aktif moleküllerdir. (69). Sitokinler hastalıkların immünopatolojilerine karşı korumada kritik öneme sahiptir. Aynı zamanda koruyucu immünitinin gelişebilmesi için hastalığa karşı doğru sitokinin üretilmesi de önem arz etmektedir. Eğer uygun olmayan bir sitokin ortaya çıkar ise hastalığın yıkıcı etkisi veya ilerlemesi söz konusu olabilmektedir (59). İmmün sistemin spesifik bir patojene karşı doğru cevabı nasıl seçtiği tam olarak bilinmemektedir (70).

Sitokinler farklı etkilere sahip hücrelerin üretilmesi ve aktive edilmesinde büyük etkiye sahip olan düzenleyicilerdir. T hücreleri ve makrofajlar sitokinlerin önemli bir kaynağıdır, fakat bu hücreler birçok fizyolojik yanıtta rol oynamaktadır. Sitokinler düşük molekül ağırlığına sahip proteinlerdir ve immünite veya enflamasyonun aşamalarını, şiddetini ve süresini düzenlemektedir. Sitokinler çoğunlukla geçici olarak üretilmekte, çok düşük miktarlarda yüksek etki göstermekte ve spesifik hücre yüzey reseptörleri ile etkileşime geçmektedir (71). Bazı sitokinler belirli hücrelerde

üretilebilmektedir. Örneğin; IL-2 T hücreleri tarafından üretilebilirken, IL-1 ve IL-6 birçok farklı hücre tarafından da üretilebilmektedir. Sitokinlerin hedef hücreleri de aynı şekilde bir veya birden fazla olabilmektedir (72). Sitokin ile etkileşime giren hücre yanıtı, sitokinin lokal konsantrasyonuna, hücrenin çeşidine ve hücreye etki eden diğer düzenleyici mekanizmalara bağlıdır (71).

İmmün yanıtların büyük çoğunluğu lokal olarak gerçekleşmektedir. 1976 yılında IL-2'nin keşfi ile birlikte immün hücrelerin çoğalma ve farklılaşma fonksiyonlarına etkisi olan birçok sitokin ortaya çıkmıştır. Bu nedenle immün sistemin birçok etkileşimi içeren kompleks bir yapıda olduğu düşünülmektedir. Mosmann çeşitli mikroorganizmaların savunma sistemlerini yıkabilmek için bu karmaşık sistemin gerekli olduğunu belirtmektedir. Mikroorganizmalar, insan konaklarına karşı daha hızlı evrilebildiği için tek bir immün mekanizma bu enfeksiyöz ajanların ürettiği her yeni ürüne karşılık veremeyecektir. Bu nedenle çoklu düzenleyici mekanizmaların bulunması patojen müdahalesine karşı bir savunma sağlayabilmekte ve homeostazın korunmasında önemli rol oynayabilmektedir (73).

Enflamatuvar sitokinler fagositlerin bakterisidal kapasitelerini güçlendirmekte, enfeksiyon bölgesine ek doğal bağışıklık hücrelerini toplamakta, denditik hücrelerin olgunlaşmasını indüklemekte ve takip eden immün yanıtı işgalci mikroorganizmalara yöneltmektedir (47). Anti-enflamatuvar sitokinler bu süreci inhibe etmekte veya enflamatuvar sürecin yoğunluğunu baskılamaktadır. IL-4, IL-10, IL-13 ve Transform edici büyüme faktörü (TGF- $\beta$ ) bu grupta bulunan sitokinlerdendir. Bu sitokinler IL-1, Tümör nekrotizan faktör  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) gibi kemokinlerin üretimini baskılamaktadır (74). Sitokinlerin düzensiz salgılanmaları patolojiyi indükleyebilmektedir. Periodontal hastalıkta pro-enflamatuvar ve anti-enflamatuvar sitokinler arasındaki denge pro-enflamatuvar aktivite lehine bozulmaktadır (75).

### **2.2.1. İnterlökin-1 Ailesi**

IL-1 üyeleri gen klonlama ve moleküler tanımlama ile bulunmuş kompleks bir sitokin ailesidir (Tablo 2.4). Bu sitokin ailesi içinde IL-1  $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-33, IL-36, IL-37 ve IL-38 bulunmaktadır. IL-1 ailesi hem doğal hem edinilmiş bağışıklık yanıtında görev almaktadır ve bu sitokinlerin enflamasyon, otoimmünite, kardiyovasküler hastalıklar ve kanser ile ilişkileri kanıtlanmıştır. IL-1 ailesi 11 molekül ve 10 ilişkili reseptörden oluşmaktadır (76).

IL-1 ailesi içinde IL-1, IL-18 ve IL-33 mikrobiyal veya çevresel bir saldırı karşısında myeloid ve lenfoid hücrelerin farklılaşması ve polarizasyonunu indükleyen ana üyeler olarak öne çıkmaktadır. Bu sitokinlerin periodontitis üzerindeki etkisi geniş bir kapsamda incelenmiştir. Fakat bu ailede bulunan IL-37'nin anti-enflamatuvar etkiye sahip olduğu gözlenmiştir (76,77).

IL-1 ve IL-33 yapısal olarak benzerliklerinden dolayı aynı aile içinde kategorize edilmektedir. IL-1 $\beta$ , IL-1R (IL-1 ilişkili reseptörü kodlar) ve IL-1N (IL-1Ra reseptör antagonistini kodlar) genlerinde meydana gelen polimorfizmlerin periodontitise karşı duyarlılığı arttırdığı gösterilmiştir. Bu durum IL-1 $\beta$ 'nın periodontitis patogenezinde rol oynadığını göstermektedir (78). IL-1 $\beta$  salgılanması konak-mikroorganizma etkileşimi ile uyarılmaktadır ve Th1 ve Th2 hücrelerinin aktivasyonunu sağlamaktadır (79). Buna ek olarak IL-1 $\alpha$ , IL-23 ve IL-6 ile birlikte Th17 hücrelerinin aktivasyonunu ve salgılanmasını sağlayarak tip 3 immünitede de rol oynamaktadır (80,81). Gingival sulkus sıvısında bulunan toplam IL-1 $\beta$  miktarının periodontitisin şiddeti ile ilişkisi olduğu ve cerrahi olmayan periodontal tedavi ile birlikte miktarının azaldığı bulunmuştur (6,82). Bunlara ek olarak pro-IL-1 $\beta$ 'nin aktif formuna dönmesini düzenleyen NLRP3 (nod benzeri reseptör proteini 3) enflamazomu da periodontitis hastalarının periodontal dokularında izlenmiştir (83).

Hedef hücrelerdeki reseptörler ve düzenleyici moleküllerin farklı seviyelerde salgılanmaları nedeniyle IL-1 ailesindeki sitokinlerin fonksiyonları spesifikdir. IL-33 hem homeopatik hem de parankimal hücrelerden salgılanmakta ve tip 2 lenfoid hücreler ve Th2 hücrelerinin düzenlenmesinde görev almaktadır (84). Kronik periodontitis hastalarının periodontal dokularında artmış IL-33 seviyeleri tespit edilmiştir (85). Fakat gingival sulkustaki IL-33 miktarının artması konusu tartışmalıdır (76). In vitro ve in vivo hayvan çalışmalarında *P. gingivalis* bakterisine ait gingipain, fimbria ve lipopeptid tarafından IL-33'ün salgılanmasının indüklendiği tespit edilmiştir (86,87).

IL-18'in ilk olarak tip 1 immünite ile ilişkili interferon  $\gamma$  (IFN-  $\gamma$ ) uyarıcı ve natural killer (NK) ve Th1 hücrelerin aktivatörü etkilerine sahip olduğu keşfedilmiştir (88). IL-18 artışına sebep olduğu tespit edilen polimorfizmler ile artmış periodontitis riski arasında ilişki olduğu belirtilmiştir (89). Buna ek olarak kronik periodontitis hastalarının gingival sulkus sıvısı, tükürük ve serum IL-18 miktarlarında artış olduğu ve cerrahi olmayan periodontal tedavi ile birlikte IL-18 miktarında azalma gözlemlendiği tespit edilmiştir (76). *P. gingivalis* ve *P. gingivalis* bakterisine ait lipopolisakkarit ürünü

de IL-18 salgılanmasını arttırmaktadır (90). IL-18 ayrıca matris metalloproteinaz salgılanmasını stimüle etmekte (91) ve IL-18'in oral enfeksiyon sonrası aşırı salgılanması enflamatuvar kemik yıkımına sebep olmaktadır (92).

Bu sitokinler makrofajlar, dendritik hücreler, epitelyal hücreler, keratinositler ve fibroblastlar tarafından salgılanabilmektedir. IL-1 $\alpha$  intraselüler olaylarda düzenleyici ve lokal enflamasyonda mediatör rolündedir. IL-1 $\beta$  ise öncelikli olarak hücrelerden salgılanan ekstraselüler bir proteindir (93). IL-1 $\beta$  geninde oluşan polimorfizmlerin periodontitise duyarlılık ile ilişkili olduğu bulunmuştur (78). Bu durum IL-1 $\beta$ 'nın periodontitis patogeneğinde rol oynadığını göstermektedir. IL-1 $\beta$  konak ile bakteri etkileşimi ile salgılanmakta ve Th1 ve Th2 hücrelerinin büyümelerini ve aktivasyonlarını uyarmaktadır (79). Bunlara ek olarak gingival sulkus sıvısında bulunan toplam IL-1 $\beta$  miktarı periodontitisin seviyesi ile ilişkilendirilmiş ve cerrahi olmayan periodontal tedavi ile birlikte miktarının azaldığı tespit edilmiştir (82,94).

**Tablo 2.4.** İnterlökin 1 sitokin ailesi isimlendirme ve fonksiyonları (93)

Sitokin	Diğer isimleri	Sistematik isim	İmmünolojik fonksiyonu
IL-1 $\alpha$	IL-1 ve lökosit aktive edici faktör (IL-1 $\beta$ ile birlikte)	IL-1F1	Pro-enflamatuvar etkiye sahip IL-1R1 agonisti, fakat çoğunlukla intraselüler transkripsiyonel düzenleyici
IL-1 $\beta$	IL-1 ve lökosit aktive edici faktör (IL-1 $\beta$ ile birlikte)	IL-1F2	TNF- $\alpha$ ile sinerjik etki, pro-enflamatuvar yanıtları aktive eder, endotelial hücrelerde adhezyon moleküllerinin salgılanmasını artırır ve diyapedez ve akut faz yanıtını teşvik eder
IL-1Ra		IL-1F3	IL-1R1 antagonisti, IL-1 bağımlı sinyali önler
IL-18	IFN- $\gamma$ indükleyici faktör, IL-1 $\gamma$	IL-1F4	T hücreleri ve NK hücrelerinden IFN- $\gamma$ üretimini uyarır ve IL-12 ile sinerjistik olarak Th1 yanıtını teşvik eder
IL-1F5	IL-1Hy1, FIL1 $\delta$ , IL-1L1, IL-1 $\delta$ , IL-1H3, IL-1RP3	IL-1F5	Muhtemel IL-1Rrp2 reseptör antagonisti
IL-1F6	FIL1 $\epsilon$	IL-1F6	IL-1Rrp2 reseptör agonisti, epitelyal hücrelerde IL-6, IL-8 üretimini artırır.
IL-1F7	FIL1 $\zeta$ , IL-1H4, IL-1RP1, IL-1H1	IL-1F7	IL-18 bağlayıcı protein ile etkileşime geçerek IL-18 aktivitesinin azaltır
IL-1F8	FIL-1 $\eta$ , IL-1H2	IL-1F8	IL-1Rrp2 reseptör agonisti, epitelyal hücrelerde IL-6, IL-8 üretimini artırır. Ayrıca kondrosit ve sinoviyal fibroblastlarda IL-6 ve IL-8 üretimini upregüle eder
IL-1F9	IL-1H1, IL-1RP2, IL-1 $\epsilon$	IL-1F9	IL-1Rrp2 reseptör agonisti, epitelyal hücrelerde IL-6, IL-8 üretimini artırır.
IL-1F10	IL-1Hy2, FKSG75	IL-1F10	Çözünebilir IL-1R1 bağlayıcı, fonksiyonu bilinmiyor
IL-33	NF-HEV	IL-1F11	ST2 reseptör agonisti. Th2 sitokin salgılanmasını uyarır. Endotelial hücrelerde intraselüler transkripsiyonel düzenleyici

### 2.2.2. İnterlökin 10

IL-10 anti-enflamatuvar sitokin olarak tanımlanmakta olup koruyucu antikorların üretimini uyarmaktadır (95). Antijen sunan hücreler, Th2 hücreleri ve Th17 hücreleri ve pro-enflamatuvar sitokinlerin üretimi üzerinde ise geniş baskılayıcı etkiye sahiptir (76). Bunlara ek olarak aktive olmuş T hücrelerinden RANKL salgılanmasını da baskılayabildiği rapor edilmiştir (96).

### 2.3. Serbest Radikaller

Oksijen tüm canlıların hayatta kalması için gereklidir. Oksijen, mitokondrilerde enerji üretiminin sağlandığı elektron transport zincirinde son elektron alıcısı olarak görev yapmaktadır. Bu sistemde kaçan elektronların oksijen ile ekspozu ise serbest radikallerin oluşmasına neden olmaktadır (97).

Serbest radikal, son yörüngesinde bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron bulduran ve bağımsız olarak var olabilen herhangi bir yapı olarak tanımlanmaktadır (Tablo 2.5). Bu durum serbest radikali diğer moleküllere karşı aşırı reaktif yapmaktadır. Canlı hücreler endojen veya eksojen kaynaklar aracılığıyla bu oksidatif ürünlere sürekli olarak maruz kalmaktadır (98).

Serbest radikaller çeşitli mekanizmalarla doku hasarına neden olabilmektedir. Bu mekanizmalar: DNA hasarı, lipid peroksidasyon, protein hasarı, önemli enzimlerin oksidasyonu ve pro-enflamatuvar sitokinlerin salınımı olarak sayılabilir (97).

**Tablo 2.5.** Gerçek radikal ve reaktif oksijen türleri (10)

Gerçek Radikaller	Radikal Sembolü	ROT	ROT Sembolü
Süperoksit	$O_2^{\cdot-}$	Hidrojen peroksit	$H_2O_2$
Hidroksil	$\cdot OH$	Hipokloröz Asit	$HOCl$
Perhidroksil	$HO_2^{\cdot-}$		
Hidroperoksil	$HOO\cdot$	Tekli oksijen	$^1O_2$
Alkoksil	$RO\cdot$	Ozon	$O_3$
Ariloksil	$ArO\cdot$		
Arilperoksil	$ArOO\cdot$		
Peroksil	$ROO^{\cdot-}$		
Asiloksil	$RCOO\cdot$		
Asilperoksil	$RCOOO\cdot$		

## 2.4. Reaktif Oksijen Türleri ve Periodontitis

Reaktif oksijen türleri (ROT) kısa ömürlü, yüksek reaktiviteye sahip oksijen ürünleridir. Süperoksit ( $O_2^-$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), hidroksil radikali ( $\cdot OH$ ) ve tekli oksijen ( $^1O_2$ ) bu grupta yer almaktadır (99). ROT'ların periodontitis üzerindeki rolü kapsamlı bir şekilde incelenmiştir (10,100). Hücresele seviyede ROT ökaryotik hücrelerin hücresele sinyal iletimi, hücresele farklılaşma ve apoptoz gibi fizyolojik süreçler için esansiyel önem taşımaktadır (101). Bunlara ek olarak ROT patojenlerin oksidatif yollarla öldürülmesine katkıda bulunmaktadır (102). Tamaki ve ark.'nın yaptığı klinik bir çalışmada *P. gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) ve *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*) gibi spesifik periodontal patojenlerin serum immunoglobulin G (IgG) seviyeleri ile serum reaktif oksijen metabolitleri arasında bir ilişki olduğunu belirtmiştir (103). Fakat ROT ve antioksidan defans sistemi arasında homeostatik düzenin bozulması durumunda oksidatif stres yanıtı tetiklenebilmektedir ve bu durum periodontitis ile ilişkilidir. Klinik olarak periodontal parametreler ile total oksidatif durum (TOS) seviyeleri arasında güçlü bir pozitif ilişki bulunmaktadır (104). Azalmış ROT seviyeleri osteoklast farklılaşma marker genlerinin ve buna bağlı kemik kaybının azalmasını sağlamaktadır (105). ROT nükleer faktör kapp NF- $\kappa$ B gibi redoks hassasiyetli gen transkripsiyon faktörlerini uyararak immün yanıtı uyarabilmektedir (106). Bunlara ek olarak ROT, c-Jun N-terminal kinaz (JNK) aktivasyonu ile hücrede apoptozu başlatabilmektedir (107).

ROT ve otofaji arasında ilişki bulunduğuna dair veriler günümüzde ortaya çıkmaktadır. Otofaji hücrenin lizozomal bozulma yoluyla kendisini sindirme sürecidir (108). Otofaji yolağı ve ROT arasında karşılıklı kompleks bir ilişki bulunmaktadır. Çalışmalar ROT'un otofajiyi etkilediğini ve otofajinin ROT'u düzenlediğini göstermektedir (109,110). Otofaji beş basamaktan oluşur:

- İndüksiyon
- Genişleme
- Tamamlama
- Yapışma ve füzyon
- Degredasyon (111)

ROT ile otofajinin düzenlenmesi otofaji sinyal yolları ve otofaji ilişkili genleri içeren karışık bir sistemdir. Kanser gelişiminde ROT, otofaji sürecini düzenleyerek hem sitoprotektif hem de sitotoksik rol oynayabilmektedir (112). Güncel olarak otofajinin

bakteriyel eliminasyon, spesifik periodontal patojenlerin hücre içine penetrasyonu, immün yanıtı baskılama ve periodontal hücre apoptozunu inhibe etme gibi yollarla periodontitis patogenezinde rol oynadığı düşünülmektedir (113–115).

#### **2.4.1. Reaktif Oksijen Türlerinin Homeostazı**

ROT endojen olarak peroksizomlar, endoplazmik retikulum, bazı enzimler (nikotinamid adenin dinükleotit (NADPH) oksidaz, ksantin oksidaz, siklooksijenaz ve lipoksijenaz) ve mitokondriyal elektron transfer zincirinde (ETZ) üretilmektedir (116). Bir günde bir hücre içerisinde üretilen ROT miktarı 1 milyarı bulmaktadır. ROT üretiminde ana kaynak ETZ'dir (117). ETZ'de elektronlar, elektron donörlerinden (NADH) elektron alıcılarına ( $O_2$ ) redoks reaksiyonları ile iletilerek işlem sonucunda adenzin trifosfat elde edilmektedir. Mitokondride  $O_2$ 'ye prematür elektron kaçakları gerçekleşebilmekte ve bunun sonucunda yan ürün olarak ortaya  $O_2^{\cdot-}$  çıkmaktadır. Bu molekülün hücre membranında süperoksit dismutaz 1 (SOD1) ve hücre matriksinde süperoksit dismutaz 2 (SOD2) tarafından dismutasyon reaksiyonuna girmesi ile  $H_2O_2$  oluşmaktadır. Sonrasında glutatyon peroksidaz veya CAT enzimi ile  $H_2O_2$ , suya ( $H_2O$ ) indirgenmektedir (118).  $H_2O_2$  bazen fenton veya Haber-Weiss reaksiyonları ile  $\cdot OH$  molekülüne indirgenebilmektedir (119). ETZ yapıları 4 kompleksten oluşmaktadır. ETZ'de ROT üretimi birincil olarak kompleks I'de ve kompleks III'te meydana gelmektedir (120).

Hücrede oluşan ROT'u ortadan kaldırmak için enzimler (SOD, GSH-Px, ve CAT), küçük moleküller (Vitamin C ve glutatyon (GSH)) ve glutaredoksin ve tiyoredoksin sistemleri mevcuttur. Bu mekanizmalar ile birlikte redoks homeostazı sağlanmaktadır (121). ROT üretimi ve eliminasyonu arasındaki bu denge insan sağlığı için önemlidir. ROT'un aşırı üretimi, antioksidanların eksikliği veya antioksidan enzimlerin inhibisyonu oksidatif strese neden olmakta ve biyolojik makromoleküllerde (lipidler, proteinler ve DNA) hasara yol açmaktadır. ROT; kanser, periodontitis, kardiyovasküler hastalıklar ve diyabet gibi çeşitli hastalıkların gelişimi ile ilişkilidir (99).

#### **2.4.2. Reaktif Oksijen Türlerinin Periodontitis İle İlişkisi**

ROT periodontal hastalıklar konusunda hem iyi hem kötü sonuçlara neden olmaktadır. İnsan hücre kültüründe düşük konsantrasyonda proliferasyon ve



farklılaşmayı uyarırken, yüksek konsantrasyonlarda periodontal dokularda sitotoksik etkilere sebep olmakta ve patojenlerin öldürülmesinde rol oynamaktadır (10,122).

Periodontitis polimikrobiyal disbiyoz ile ilişkili oral enfeksiyon kaynaklı bir hastalıktır (123). *P. gingivalis*, *Tanneralla Forsythia* gibi periodontitis temel patojenleri periodontal doku homeostazını bozarak enflamasyona sebep olmaktadır (124). Bu temel patojenler genellikle gram negatif anaerobik veya fakültatif bakterilerdir ve bu bakteriler ortamdaki oksidatif değişikliklere karşı duyarlıdır (125). ROT hücrel oksidatif ortamı bozarak patojenlerin öldürülmesinde rol oynamaktadır. In vitro bir çalışmada lökositler *P. gingivalis* lipopolisakkarit ürününe veya *F. nucleatum*'a maruz bırakıldığında ROT üretiminin arttığı gözlenmiştir (126). Lamont ve ark. 2016 yılında yaptığı bir çalışmada ise H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> molekülünün polimikrobiyal sinerjide ana belirleyici olduğu belirtilmiştir (127). Fakat *Treponema denticola* periodontal patojeninin ROT üretimini baskılayıcı stratejiler geliştirdiği keşfedilmiştir (128).

Zararlı etkilerine karşılık ROT bazal seviyelerde hücrel homeostaz ve hücre ölümünde sinyal iletimine katılan ikincil mesajcı görevi görmektedir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> periodontal dokularda mitojen aktive protein kinazlar ve NF-κB yoluyla defansif enflamatuvar yanıtı aktive etmektedir (129). Buna ek olarak düşük konsantrasyonlarda sürekli H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üreten glukoz oksidaz enzimi runt ilişkili transkripsiyon faktörü-2'nin upregülasyonu yoluyla insan periodontal ligament fibroblastlarının proliferasyonunu ve osteoblastik farklılaşmasını stimüle edebilmektedir (130). Fakat H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> molekülü çoğunlukla hücre proliferasyonu ve farklılaşmasında inhibitör etki göstermektedir (131). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> molekülünün farklı etkiler göstermesinin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonuna ve bulunduğu hücrenin tipine göre değiştiği düşünülmektedir (111). Buna örnek olarak Burdon ve ark. yaptıkları çalışmada bebek hamster böbrek fibroblastları-21 bulduran kültüre 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklediğinde hücre sayısında artış gözlemlenmiş fakat ortama 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklendiğinde hücre sayısı hızlı bir şekilde azaldığını rapor etmiştir (132).

Oksidatif stres antioksidan sistemin yetersiz kalacağı seviyede ROT üretildiğinde ortaya çıkmakta ve bu periodontal yıkıma neden olmaktadır (100). Periodontitis hastalarında serum total antioksidan seviyenin (TAS) sağlıklı hastalara göre daha düşük seviyede olduğu gözlenmiştir (111). Periodontitis markerları tükürükte de gözlenebilmektedir (133). Kronik periodontitisli hastalarda tükürük TAS değerlerinin sağlıklı hastalara göre daha düşük olduğu bulunmuştur (134). Bunlara paralel olarak periodontitis hastalarında total oksidan seviyenin (TOS) de kontrol gruplarına göre

yüksek seviyede olduğu gözlenmiştir (7). Bu verilere göre azalmış TAS değerleri ve artmış ROT miktarı periodontitis için risk faktörü olabilir veya periodontal enflamasyon nedeniyle bu durum ortaya çıkabilmektedir. Fakat redoks durumunun periodontitis sebebi mi yoksa sonucu mu olduğu sorusunun cevabı kesin değildir (111).

Periodontal doku hasarı ROT tarafından oksidatif stres yoluyla direk olarak veya enflamasyon, apoptoz ve diğer faktörlerin sinyal yollarının aktivasyonu yoluyla indirek olarak meydana gelebilmektedir (111). ROT kaynaklı direk doku hasarı şu sıra ile gerçekleşmektedir:

- Lipid peroksidasyonu ve hücre membranının yıkılması (135),
- Protein denatürasyonu ve enzim deaktivasyonu (136),
- Nükleik asit hasarı ve kromozom bozulması (137),
- Mitokondriyal hasar ve ROT patlaması (138).

Doku yıkımı seviyesi sırasıyla lipid peroksidasyonu, protein hasarı ve DNA hasarı için biyolojik markerlar olan MDA, protein karbonilasyonu ve 8-hidroksi-2-deoksiguanozin moleküllerinin miktarları ölçülerek değerlendirilebilmektedir (111,139,140).

ROT'un sinyal iletimi ve gen transkripsiyonunu düzenleyerek periodontal doku hasarına neden olmasına ait 4 yolak bulunmaktadır:

- ROT NF- $\kappa$ B aktivasyonu ile enflamatuvar ve immün yanıtı düzenleyen sinyal kaskadını indüklemektedir (141).
- JNK aktivasyonunu uyararak hücre apoptozuna neden olmaktadır (142).
- Enflamazom aktivasyonuna neden olmakta ve piroptik hücre ölümü gerçekleşmektedir (143).
- Otofajide rol almaktadır (117).

ROT ile NF- $\kappa$ B sinyal aktivasyonu pro-enflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin salınmasına neden olmaktadır (144). Bu sitokinlerin salgılanması enflamatuvar yanıtı ve osteoklastik farklılaşmayı tetikleyerek periodontal yıkıma neden olmaktadır (145). Bu etki eksojen olarak antioksidanların eklenmesi ile önlenmektedir. Örneğin, NF- $\kappa$ B aktivasyonu yapmakta olan ROT antioksidanlar tarafından ortadan kaldırıldığında RANKL tarafından uyarılan NF- $\kappa$ B aktivasyonu da sona ermektedir (146). Thummuri ve ark. yaptığı bir çalışmada bir antioksidan olan timokinonun enflamasyon kaynaklı ROT üretimini ve osteoklast öncülerinde NF- $\kappa$ B aktivasyonunu inhibe ettiğini gözlemlemiştir (147).

ROT, periodontitis esnasında JNK sinyalini tetiklemektedir. ROT kaynaklı JNK sinyal aktivasyonunun periodontal birleşim epitelini E-kadherin ayrışması yoluyla bozduğu gözlemlenmiştir (148). Buna paralel olarak insan dişeti fibroblastlarında nikotin uyarılması ile üretilen ROT'un JNK fosforilasyonuna neden olduğu tespit edilmiştir. JNK aktivasyonu ise kaspaz-3 bağımlı yolak üzerinden hücre apoptozunu başlatmaktadır (149). Buna karşın bakteriyel saldırıya karşı oluşan JNK aktivasyonunun antiapoptotik etkisi olduğu gözlemlendiği bir çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmaya göre JNK aktivasyonu Forkhead box protein O1 transkripsiyon faktörünü uyararak oksidatif stres ve apoptoz karşıtı genlerin ekspresyonunu sağlamıştır (148).

ROT'un periodontal patogeneze dahil olduğu diğer bir yol da enflamazomların aktivasyonudur. ROT NLRP3 aktivasyonunu uyararak tiyoredoksin etkileşimli proteinin tiyoredoksinde ayrışmasına neden olmaktadır (150). Periodontitis hastalarında sağlıklı kontrollere göre daha yüksek seviyede NLRP3 bulunduğu ve pro-enflamatuvar sitokinlerin (IL-1 $\beta$  ve IL-18) salgılanmasında artış olduğu rapor edilmiştir (151).

#### **2.4.3. Lipid Peroksidasyon**

Reaktif oksijen türlerinin intraselüler üretimi ve ekstraselüler salgılanması *F. nucleatum* gibi periodontopatojen bakterilerin PMNL'leri stimüle etmesi ile gerçekleşmektedir. Özellikle periodontopatojen bakteriler tarafından nötrofillerin uyarılması ile ROT'ların ekstraselüler salgılanması artış göstermektedir (152). Reaktif oksijen türlerinin hücre membranındaki yağ asitlerini etkilemesi ile oluşan reaksiyon lipid peroksidasyon olarak adlandırılır. Lipid peroksidasyonu membranların geçirgenliğini bozarak hücre ölümüne yol açabilen olayları başlatmaktadır (153). Lipid peroksidasyonunun kantitesini değerlendirmek için lipid peroksidasyonun son ürünü olan MDA seviyesi ölçülmektedir (154). Ekstraselüler ROT nedeniyle lipidlerde oluşan hasarın tahmin edilmesi üzerine yapılan bir çalışmada normal ve stimüle edilmiş nötrofiller üzerinde LPO varlığı ölçülmüştür. Bu çalışmada stimüle olan nötrofillerin ekstraselüler ROT salgılanmasına neden olduğu ve bu durumun lipid molekülleri üzerinde yoğun oksidatif hasara neden olduğu tespit edilmiştir (155).

#### **2.4.4. Protein Hasarı**

İn vitro çalışmalarda enflamatuvar koşullarda üretilen ROT'un periodontal dokulardaki kollajen, proteoglikan ve glikozaminoglikan gibi majör ekstraselüler matris yapılarında bozulmaya neden olduğu gösterilmiştir (152). Sağlıklı insanlardaki

PMNL ile periodontitis başlangıç aşamasındaki hastaların karşılaştırıldığı bir çalışmada hastalıklı grup PMNL hücrelerinde  $O_2^-$  içeriğinin daha fazla olduğu tespit edilmiştir (156). Kronik apikal periodontitis ve kronik periodontitiste de  $O_2^-$  miktarında artış gözlenmiştir (157,158). Canlı hücrede  $O_2^-$  ortamda  $Fe^{2+}$  iyonu varlığında hidrojen peroksit gibi diğer ROT'lar ile etkileşime girerek yüksek reaktivite gösteren hidroksil radikalinin üretimine neden olmaktadır (159).

Gingival enflamasyon sürecinde bakteriyel yapılar ve hatta bazen tüm bakteri bağ dokusuna penetre olarak fagositik hücreler ve fibroblastlar ile etkileşime geçmektedir (160). ROT'ların dişetinde hyaluronik asit ve proteoglikanları depolimerize ettiği gösterilmiştir (161). Ayrıca özellikle hidrojen peroksite karşı glikozaminoglikan zincirlerine karşı daha duyarlıdır. Fakat ikisi de enflamatuvar periodontal hastalıkta hidroksil radikalinin varlığında kapsamlı olarak bozulmaya uğramaktadır (162).

ROT fibroblastlar ve osteoklastlar tarafından da üretilmektedir (163,164). Bazı çalışmalar ROT'un alveolar kemik proteoglikanlarını bozduğunu göstermiştir. Bozulma protein çekirdeğinin ve glikozaminoglikan zincirlerinin ayrılması şeklinde gözlenmiştir (164). Protein çekirdek yapıları sadece hidrojen peroksite karşı glikozaminoglikan zincirlerine karşı daha duyarlıdır. Fakat ikisi de enflamatuvar periodontal hastalıkta hidroksil radikalinin varlığında kapsamlı olarak bozulmaya uğramaktadır (152).

Periodontal dokularda ROT'un diğer bir hedefi ise antikollajenaz enzimidir. Bu enzim kollajen yapılarının korunmasında önemli bir role sahiptir (165).

#### **2.4.5. Pro-enflamatuvar Sitokinler Üzerinden Etki**

Direk intraselüler ve ekstraselüler etkilerinin yanında ROT pro-enflamatuvar gen ekspresyonunu arttırarak indirek olarak da hücre hasarına yol açmaktadır. Bu pro-enflamatuvar yapılar sitokinler (TNF- $\alpha$ , IL-1), kemokinler (IL-8) ve hücresel adhezyon moleküllerini kapsamaktadır (98).

#### **2.5. Antioksidan Defans Sistemleri**

Antioksidanlar, düşük konsantrasyonlarda bulunduğu oksidize olabilen substratların oksidasyonunu geciktirebilen ya da inhibe edebilen moleküller olarak tanımlanmaktadır. Antioksidanlar fonksiyon tipleri, fonksiyon gördükleri bölge, çözünürlükleri ve kaynaklarına göre sınıflandırılabilir (Tablo 2.6, Tablo 2.7, Tablo 2.8)(166).

Antioksidanların etkinlikleri lokasyonlarına (hücre içi, hücre dışı veya hücre membranında), etken reaktif oksijen türüne, diğer antioksidanlar ile etkileşimlerine ve

çevresel koşullara (pH) göre değişmektedir (166,167). Antioksidanların etki mekanizmaları ise şu şekildedir:

- Serbest radikal oluşumunun önlenmesi
- Reaktif metabolitleri ortamdan temizleyerek serbest radikallerin engellenmesi
- Serbest radikaller tarafından oluşturulan hasarın tamirinin şekillendirilmesi
- Diğer antioksidanların etkili çalışması için uygun ortamın hazırlanması (166)

**Tablo 2.6.** Etki çeşitlerine göre antioksidanlar (10)

<b>Etki türü</b>	<b>Örnekler</b>
Önleyici Antioksidanlar	Enzimler: süperoksit dismutaz enzimleri, CAT, glutasyon peroksidaz, DNA tamir enzimleri Metal iyon sekestrasyonu: albümin, laktoferrin, transferrin, haptogloblin, seruloplazmin, hemopeksin, karotenoidler, süperoksit dismutazi, CAT, glutasyon peroksidaz, glutasyon redüktaz, ürik asit, polifenolik flavonoidler
Zincir kırıcı antioksidanlar	Askorbat (vitamin C), karotenoidler (retinol ve vitamin A), ürik asit, $\alpha$ -tokoferol (vitamin E), polifenoller, bilirubin, albümin, indirgenmiş ubikinon, indirgenmiş glutasyon ve diğer tiyoller

**Tablo 2.7.** Lokasyonlarına göre antioksidanlar (10)

<b>Konum</b>	<b>Örnekler</b>
Hücre içi (intraselüler)	Süperoksit dismutaz 1 ve 2 enzimleri, CAT, glutasyon peroksidaz, DNA tamir enzimleri, indirgenmiş glutasyon, indirgenmiş ubikinon
Hücre dışı (ekstraselüler)	Süperoksit dismutaz 3 enzimi, selenyum-glutasyon peroksidaz, indirgenmiş glutasyon, laktoferrin, transferrin, haptogloblin, seruloplazmin, albümin, askorbat, karotenoidler, ürik asit
Membran ile ilişkili	$\alpha$ -tokoferol

**Tablo 2.8.** Kaynaklarına göre antioksidanlar (10)

<b>Kaynak</b>	<b>Örnekler</b>
Eksojen antioksidanlar (diyet ile alınanlar)	Karotenoidler, askorbik asit, tokoferoller, polifenoller, folik asit, sistein
Endojen antioksidanlar (Vücut tarafından sentezlenenler)	CAT, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon S-transferaz, indirgenmiş glutatyon, seruloplazmin, transferrin, ferritin, glikozilazlar, peroksizomlar, proteazlar
Sentetik antioksidanlar	N-asetilsistein, penisilamin, tetrasiklinler

Antioksidanlar vücudun farklı bölgelerinde farklı etkinlikler göstermektedir. Örneğin süperoksit dismutaz enzimleri, CAT ve glutatyon peroksidaz ekstraselüler ortamdan süperoksit ve hidrojen peroksidin temizlenmesinde çok az etkinlik göstermektedir (168). Brock ve ark. çalışmalarında dişeti oluşu sıvısı ve tükürüğün antioksidan profilinin plazma yapılarına göre çok farklı özellikler taşıdığını göstermiştir (9).

Önleyici antioksidanlar süperoksit ve hidrojen peroksidin enzimatik olarak kaldırılması veya iki değerlikli metaller ile sekestrasyonu yoluyla etki etmektedir. Böylece Fenton reaksiyonları ve ardından gerçekleşebilecek hidroksil radikal oluşumu önlenmektedir (169). Periodontal dokularda nötrofillerin yoğun olarak bulunmasından ve de laktoferrinin gingival sulkus sıvısında yüksek seviyelerde bulunmasından dolayı bu dokular için laktoferrinin transferrinden daha önemli olduğu düşünülmektedir (10,170). Zincir kırıcı antioksidanlar ekstraselüler sıvılar için en önemli antioksidan grubudur. Düşük molekül ağırlıklı türler oksidize olmadan önce elektronlarını bağışlamakta ve gereken indirgenme veya yer değiştirme reaksiyonuna elektron sağlayarak vücudun antioksidan kapasitesinin korunmasını sağlamaktadır. Yağda çözünen antioksidanlar hücre membranı seviyesinde etki ederler ve lipid peroksidasyona karşı koruma sağlamaktadır. Suda çözünen antioksidanlar ise ekstraselüler doku sıvılarında daha önemlidir (10).

Antioksidanların bazen iki bazen de 3 etki mekanizması olabileceği unutulmamalıdır. Örnek olarak askorbat zincir kırıcı etkiye sahip iken oksidize E vitaminini geri dönüştürebilmesi ile önleyici etkiye de sahiptir(171). Antioksidanların etkileri:

- Konumuna (intraselüler/ekstraselüler),
- ROT atağının doğasına,

- Ortamdaki ortak çalışabilecek diğer antioksidan türlerine,
- Çevresel koşullara (pH, oksijen gerilimi) bağlıdır (10).

## 2.6. Reaktif Oksijen Türleri ve Periodontitis Üzerine Etkisi

Reaktif oksijen türleri kısa ömürlü, oksijenin indirgenmesi ile oluşmuş yüksek reaktif moleküllerdir (111). Reaktif oksijen türleri tanımı gerçek radikal olmayan fakat, intraselüler ve ekstraselüler ortamda radikal aktiviteye neden olma kapasitesine sahip molekülleri de kapsamaktadır. Bu moleküller hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), hipokloröz asit ( $HOCl$ ), tekli oksijen ( $^1O_2$ ) ve ozon olarak sayılabilir (97).

Hücreler endojen veya eksojen geniş çeşitlilikte oksidanlara maruz kalmaktadır. Eksojen kaynaklar sıcak, travma, ultrason, ultraviyole ışık, ozon, sigara, egzoz gazları, radyasyon, enfeksiyon, aşırı egzersiz ve terapötik ilaçları içermektedir. Endojen kaynaklar temelde metabolik yolların yan ürünü olarak veya konak savunma hücreleri ve bağ doku hücrelerinin üretimi ile ortaya çıkmaktadır (152,172).

ROT üretiminden sadece fagositik hücrelerin sorumlu olduğu düşünülmekte iken güncel çalışmalarda ROT'ların apoptoz, gen ekspresyonu gibi hücre sinyallerinde rol oynadığı keşfedilmiştir (173). Fagositik hücrelerde ROT üretimi konak yanıtı sırasında fagositik hücrelerde artmış oksijen tüketimi sonucunda ortaya çıkan respiratuar patlama ile gerçekleşmektedir. Bu reaksiyonda katalizör enzim olarak NADPH oksidaz görev almaktadır (174). ROT üretiminde görev alan başka enzimler tanımlanmış olsa da NADPH oksidaz en önemli enzim olarak öne çıkmaktadır (173).

ROT periodontal hastalıklarda iyi veya kötü etkilere sahip olabilmektedir. Düşük konsantrasyonlarda, ROT periodontal ligament fibroblastlarında (PDLF) proliferasyon ve diferansiasyonu uyarmaktadır. Yüksek konsantrasyonlarda ise periodontal dokularda sitotoksik etkilere neden olmaktadır (111).

Lökositler üzerinde in vitro yapılan bir çalışmada ortama *P. gingivalis* veya *F. nucleatum* eklendiğinde ROT üretimi artış göstermiştir (126,175). Oral polimikrobiyal sinerjide determinant reaktif oksijen türünün hidrojen peroksit olduğu güncel bir çalışmada tespit edilmiştir (127). Fakat *Treponema denticola* (*T. denticola*) ROT üretimini baskılayacak stratejiler geliştirmiştir (128).

Reaktif oksijen türleri ekstraselüler matris yapılarının depolimerizasyonunda, lipid peroksidasyonda (LPO), antiproteaz gibi enzimlerin oksidasyonunda, periodontal cep tabanında apoptozun artmasında, pro-enflamatuvar sitokinlerin indüksiyonunda ve DNA hasarında aktif rol oynamaktadır (98,161,164).

### 2.6.1. Apoptoz Artışı

Birçok hücrede ROT grubunda bulunan nitrik oksit (NO) apoptozu aktive etmektedir (176). Apoptozun aktivasyonu DNA hasarına yanıt olarak da oluşabilmekte veya bu DNA hasarı ROT tarafından da oluşturulabilmektedir. DNA hasarı oluşumunda nitrik oksit ön plana çıkmaktadır. Periodontal hastalıkların hem deneysel modellerinde hem de insan örneklerinde lokal NO üretiminin arttığı raporlanmıştır (177). NO sentezinin indüksiyonu fibroblast proliferasyonunu inhibe etmekte ve apoptozu uyarmaktadır. Bu da periodontitiste karakteristik olan doku yıkımı ile yapımı arasındaki dengenin bozulması durumuna katkıda bulunmaktadır. Apoptoz ile periodontal hastalık arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir çalışmada sulkuler epitelin en derin kısmı haricinde sulkuler epitelde proliferasyonun apoptozdan daha fazla olduğu gözlenmiştir. Periodontal yıkım varlığında birleşim epiteline en yakın kısım olan periodontal cep tabanında daha fazla keratinosit apoptozu uğramaktadır (178).

### 2.7. Pistacia Cinsi

*Pistacia* cinsi *Anacardiaceae* ailesinin küçük ağaçlar ve çalılardan oluşan bir üyesidir. Tropik ve subtropik Asya bölgesine ait olup yerlileri tarafından uzun zamandır kullanılmaktadır. Türkiye’de de bu cinse ait türler bulunmaktadır (179).

*Pistacia* türlerinin menengiç adı verilen meyvelerinden uçucu yağlar elde edilmektedir. Bu yağların antibakteriyel, antifungal ve antioksidan etkileri olduğu belirtilmiştir. Bazı *Pistacia* türleri anti-enflamatuvar, antikanser, antiproliferatif etkilere sahiptir (180).

#### 2.7.1. *Pistacia eurycarpa* Yalt. Bitkisi ve Özellikleri

*P. eurycarpa* özellikle Türkiye’nin Güneydoğu Anadolu ve Doğu Anadolu bölgeleri çevresinde yetişmektedir. Bu bitki aynı zamanda *P. atlantica* var. *Kurdica* Zohary olarak da isimlendirilmiştir (Tablo 2.9) (181). 2007 yılında *P. eurycarpa* bitkisi üzerinde yapılan bir çalışmada *P. eurycarpa* ekstresinin antimikrobiyal ve antifungal etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (182).



**Tablo 2.9.** *P. eurycarpa* bitkisinin taksonomik hiyerarşisi

Alem	Plantae
Alt alem	Tracheobionta
Şube	Magnoliophyta
Sınıf	Magnoliopsida
Alt sınıf	Rosidae
Takım	Sapindales
Aile	Anacardiaceae
Cins	Pistacia
Tür	Pistacia Eurycarpa Yalt.

*Pistacia* bitkisinin çeşitli kısımlarının esansiyel yağ ve kimyasal kompozisyonlarını inceleyen birkaç çalışma bulunmaktadır (183–185). *P. eurycarpa* bitkisinin esansiyel yağ içeriğini ve biyolojik aktivitesini ölçen ilk çalışma ise Demirci ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada elde edilen verilere göre bitki içeriğinin büyük bir kısmını  $\alpha$ -pinen ve  $\beta$ -pinen oluşturmaktadır (Tablo 2.10) (179).

**Tablo 2.10.** *P. eurycarpa* esansiyel yağının antimikrobiyal etkileri (179)

Patojenik mikroorganizma	EO	Standart
<i>Escherichia coli</i> Gr (-) anaerobik	62.5	62.5
<i>Staphylococcus aureus</i> Gr (+)	125	15.62
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Gr (-)	250	250
<i>Enterobacter aerogenes</i> Gr (-)	62.5	125
<i>Proteus vulgaris</i> Gr (-) anaerobik	15.62	31.25
<i>Salmonella typhimurium</i> Gr (-)	125	62.5
<i>Candida albicans</i> (mantar)	125	125*

EO: *P. eurycarpa* esansiyel yağı, MIC: Minimum inhibitör konsantrasyon ( $\mu\text{g/ml}$ ), Standart: Kloramfenikol, \* Ketokonazol

$\alpha$ -pinen ve  $\beta$ -pinen birçok bitkinin esansiyel yağlarında bulunan, monoterpenler grubunda bulunan izomerlerdir. Bu izomerlerin antibakteriyel, anti-enflamatuvar antikanser (meme kanseri ve lösemi), antifungal etkileri bulunmaktadır. Pinenler geniş güvenlik sınırlarına sahip oldukları için çeşitli kimyasallarda kullanılmaktadır (186–191).

## 2.8. Deney Hayvanı Modelleri

Hayvan deneyi çalışmaları araştırma tarihinin erken zamanlarından beri yapılmaktadır. PubMed üzerinde yapılan bir incelemede periodontal veya periimplant

yara iyileşmesi ve rejenerasyonu üzerine 2000'den fazla çalışma yapıldığı tespit edilmiştir (192). Dokularda histolojik inceleme yapılamadığı ve yeni bir tedavinin yan etkileri bilinemediği için bu tür çalışmalar insan üzerinde yapılamamaktadır. Bu nedenle periodontal hastalığın başlaması ve ilerlemesinin araştırılması için deneysel çalışma modellerine ihtiyaç duyulmaktadır (193). Periodontal araştırma kapsamında hayvan modelleri ilk olarak periodontal hastalıkta enfeksiyon ve konak yanıtı arasındaki ilişkiyi incelemek ve hastalık sürecini anlamak için kullanılmıştır (194). Periodontal hastalığın etiyolojisinin ve patolojisinin belirlenmesinde hayvan modellerinin önemli bir rolü vardır (192).

Periodontal hastalık doku yıkımına neden olan enflamatuvar yanıt ile karakterize kompleks bir hastalıktır. İn vitro sistemler bakteri ve bakteriyel ürünlere karşı hücrel yanıtı ve sinyal yollarını tanımlamada güçlü kanıtlar ortaya sunmuştur. Fakat periodontitisin kompleks patogenezinin sadece in vitro yöntemler ile keşfedilmesi mümkün değildir (192). Örneğin, çok türe sahip biyofilm modelleri konak-parazit etkileşimlerini incelemede kullanılabilir (195). Diğer yandan bu teknikler canlı biyolojisindeki kompleks etkileşimleri laboratuvar ortamında tam olarak ortaya koyamaz. Bu nedenle in vivo modellere ihtiyaç vardır (196). Hastalığın kompleks yapısına ek olarak konağın immün yanıtı lineer değildir. Örneğin; periodontal hastalıkta, dokularda hastalık ile ilişkili mikrobiyal türlerin sayısı artış göstermekte ve enflamatuvar yanıtı daha da stimüle etmektedir (192). Oral kavite bu özelliği ile hastalık esnasında bakteri türünde azalma yaşanan diğer sindirim sistemi elemanları ile ayrılmaktadır (197).

Hayvan türleri farklı fizyolojik ve anatomik özelliklere sahip oldukları için her çalışmaya uygun değildir. Bu nedenle defektin oluşturulma şekli ile hayvan seçimine dikkat edilmelidir (193).

### **2.8.1. Defekt Oluşturulması**

Defekt oluşturulmasında farklı yollar izlenebilmektedir. Bu yollar:

- Doğal defekt modeli: Deney hayvanında hastalığın doğal yollarla oluşması beklenmektedir (193).

- Akut defekt modeli: Deney hayvanında mukoperiostal flep kaldırılarak kemik, sement ve periodontal ligament planlanan defekt boyutuna göre direk olarak şekillendirilmekte ve ardından flep kapatılmaktadır. Bu yöntemde eşit defektler oluşturulabilmekte ve zaman kazanımı sağlanabilmektedir. Farklı yöntemlerin, kimyasal

ajanların ve cihazların iyileşmeye etkisinin incelenmesinde bu yöntem kullanılabilir (198).

- Kronik defekt modeli: Deneysel hayvanında plak birikimini ve periodontal yıkımı arttıracak materyaller diş çevresine yerleştirilmektedir. Dişin çevresine veya gingival marjinin hemen apikaline materyalin yerleştirilmesi ile plak kaynaklı bir enflamasyon elde edilmekte ve bu enflamasyon zamanla apikale doğru ilerleyerek çevre periodontal dokularda yıkıma neden olmaktadır. Bu defekt modelinin bir avantajı olarak spontan iyileşme gözlenmemekte ve defekt kendiliğinden kapanmamaktadır (193). Defekt özellikle interproksimal alanlarda daha derin olarak gözlenmektedir. Bu nedenle bu çalışma modeli interproksimal defektler için daha idealdir (199).

- Akut/kronik defekt modeli: Deneysel hayvanında defekt cerrahi girişim ile oluşturulmaktadır. Akut defekt modeline ek olarak flep kapatılmadan önce spontan iyileşmenin önüne geçmek için defekt bölgesine materyal yerleştirilmektedir. Böylece akut defektin zaman kazancı avantajı sağlanmış olur (193).

### **2.8.2. Deneysel Hayvanları**

Fare, sıçan, tavşan, köpek, domuz ve insan olmayan primatlar gibi birçok hayvan deneysel modellerinde tercih edilmektedir. Bazı hayvanlarda periodontal hastalık spontan olarak oluşabilirken bazılarında deneysel olarak uyarılması gerekmektedir. Küçük hayvanlardaki büyük dezavantajlardan birisi dentisyonun insanlar ile benzer olmamasıdır. Fakat küçük hayvan modelleri periodontal hastalık gibi enflamatuvar modellerde yumuşak ve sert doku etkileşimleri konusunda literatüre büyük katkı sağlamıştır. Küçük hayvanların bir diğer avantajı ise potansiyel sistemik enflamasyon mekanizmalarının periodontal iyileşme sürecine etkisi transgenik ve nakavt hayvanlar ile in vivo olarak incelenebilmesidir (194). Sonuç olarak küçük hayvanlar daha az maliyetlidir ve insan deneylerinden önce daha büyük türlerin kullanılması ihtiyacını azaltmaktadır. Bu açıdan fare, sıçan ve tavşan için iyi tanımlanmış sistemler mevcuttur (192).

Daha büyük hayvanların dental anatomisi insanlar ile daha benzerdir. Bu durum verilerin daha direkt olarak klinik ortama aktarılabilmesini sağlamaktadır. İnsan olmayan primatlar, köpekler, koyunlar ve küçük domuzlar periodontal araştırmalar için kullanılmaktadır. İnsan olmayan primatların diş yapısı insanlar ile benzerdir ve bu hayvanlarda plak, diş taşı, mikrobiyal patojenler ve periodontal hastalık doğal olarak ortaya çıkmaktadır (200). Histolojik olarak periodonsiyum yapısı insanlar ile benzerdir.

Enflamatuvar süreçte plazma hücreleri, lenfositler ve nötrofiller bağ dokusuna infiltrasyon olmaktadır (201). Ortodontik braketer veya ligatürler plak birikimi ve periodontal hastalığı hızlandırmak için kullanılabilir. Fakat insan olmayan primatların kullanımındaki en önemli dezavantaj bu hayvanların tüberküloz gibi bazı enfeksiyonlara duyarlı olmalarıdır (200). Maliyeti azaltmak için küçük domuz türünü kullanarak çok iyi modeller üretilmiştir. Büyük hayvanları kullanmak pahalıdır ve büyük merkezlerde uygun personel, özel üretim ve bakım prosedürleri gerektirir (Tablo 2.11)(192).

**Tablo 2.11.** Periodontal hastalık çalışmalarında hayvan modellerinin avantaj ve dezavantajları (202)

Hayvan Modeli	Avantajlar	Dezavantajlar
İnsan olmayan primatlar	İnsanlara benzer dental yapı, mikroflora Doğal veya deneysel olarak periodontitis oluşumu	Çok pahalı, etik sorunlar, bakımları zor
Köpek	İnsanlara benzer şekilde doğal veya deneysel periodontitis oluşumu	Göreceli olarak pahalı, özel bakım ihtiyacı ve sorunları. Dentisyon insandan farklı
Mini domuz	Dental yapı ve periodontitis süreci insanlara benzer.	Göreceli olarak pahalı, bakım sorunları mevcut.
Gelincik	Doğal veya deneysel periodontitis oluşumu İnsanlara benzer şekilde doğal veya deneysel periodontitis oluşumu	Hakkında yapılmış çalışmalar az Bakım problemleri
Kemirgenler	Deneysel periodontitis oluşumu. Molar diş yapısı insanlara benzer. Göreceli olarak uygun maliyet	Periodontitise doğal direnç mevcut. Mikrobiyota insandan farklı. Boyutu küçük olduğundan analiz için doku yetersizlik problemi olabilir. Çok sayıda hayvan gerekliliği

### 2.8.3. Ligatür ile Periodontitis Oluşturulması

Hayvanlarda periodontitisi taklit edebilmek için kullanılan en sık yöntem ligatür yöntemidir (203). İpek ligatür mandibular veya maksiller molar dişlerin servikal bölgesine yerleştirilerek bakteriyel kolonizasyona sebep olmakta ve biyofilm birikimini desteklemektedir. Böylece epitelyal migrasyon ve kemik kaybı gibi hastalığa benzer klinik durumlar ortaya çıkmaktadır (204). Ligatür ile deneysel periodontitis çalışmalarında bağ doku ve kemik kaybı 7-15 gün arasında oluşmaktadır (205). Germ free sıçanlarda yapılan bir çalışmada ligatür uygulamasının anlamlı bir kemik rezorpsiyonuna neden olmadığı gözlenmiştir. Bu nedenle ligatür liflerinin arasındaki

bakteri akümülyasyonunun hastalığın ilerlemesinde önemli rol oynadığı belirtilmiştir (206).

Ligatür yerleştirilmesinin birinci gününde histolojik olarak furkasyon ve interproksimal bölgelerde kemik rezorpsiyonu gözlenmektedir. Fakat 3. gün ile karşılaştırıldığında kemik kaybı açısından anlamlı bir fark yoktur. 5. günde ise anlamlı derecede kemik kaybı gözlenmektedir. Radyografik olarak kemik kaybı 14. güne kadar artarak devam etmektedir. 14. günden sonra kemik kaybında azalma izlenmektedir. Bu da deneysel periodontitisin iki fazdan oluştuğunu göstermektedir. Akut faz (0-14 gün) sürecinde artan kemik kaybı olmaktadır kronik fazda periodontal enflamasyon ve kemik kaybı azalma göstermektedir. Alveolar kemik kaybı sonrası periodontal dokuların apikale migrasyonu gerçekleşmektedir. Periodontal dokuların apikale migrasyonu ile biyolojik genişliğin sağlanması ve hastalığın şiddetinin azalması 14. günden sonra periodontal yıkımın yavaşlamasının açıklaması olabilir (207).

İpek sütür üzerinde canlı patojen mikroorganizmaların inkübasyonu hastalığın şiddetini arttırmaktadır (208). Ligatüre yerleşen mikroorganizmalar toksin içeren PAMP gibi bazı virülans faktörler üretmek daha kompleks konak yanıtına neden olmaktadır. Osteoklastogenezde görev alan sitokinler ve diğer moleküller incelendiğinde IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  ve RANKL seviyelerinin artış gösterdiği tespit edilmiştir. Ligatür yerleşiminin ilk haftasında pro-enflamatuvar sitokinlere ait mRNA ekspresyonu anlamlı derecede artış göstermektedir. Fakat 2 ve 3. haftalarda mRNA ekspresyonunda anlamlı bir fark gözlenmemektedir (209).

Osteoklast öncülerinde sentezlenen RANK ile RANKL karşılaşması osteoklast aktivasyonunda görevli birincil mekanizmadır. RANKL etkisinin düzenlemesi, RANK ve RANKL etkileşimini önlemekte görevli olan OPG tarafından yapılmaktadır (210). RANKL ve OPG proteini arasındaki dengenin bozulması periodontitis gibi birtakım metabolik kemik hastalığının patogenezinde rol oynamaktadır. Bu kapsamda RANKL ve OPG seviyeleri ligatür yerleşiminden 3 ve 5 gün sonrasında anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (209). Sağlık durumundan periodontal hastalığa geçiş ile ilişkili olan artmış mikrobiyal yük de pro-enflamatuvar sitokinlere ait mRNA sentezinin artışına neden olmaktadır (211).

### 3. MATERYAL VE METOT

Çalışmamız İnönü Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 84476130-050.99 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

#### 3.1. Deney Hayvanları

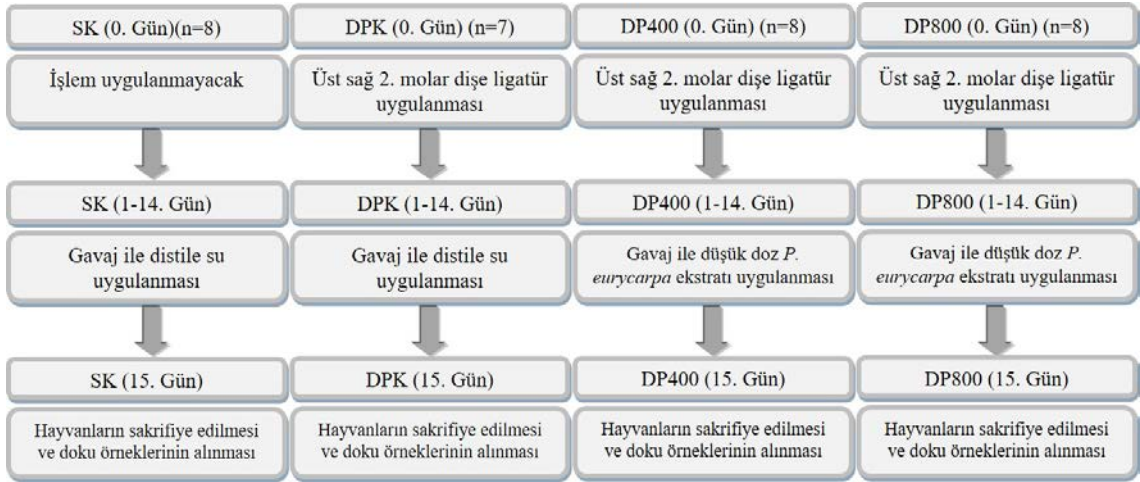
*Wistar albino* cinsi 32 adet rat İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nde üretildi. Deney hayvanları üretildikten sonra belirli ağırlık seviyesine gelmeleri beklendi. 8-10 haftalık süreçte 200-250 gr aralığındaki ağırlığa ulaşan 32 adet rat çalışmaya alındı. Ratlar plastik kafeslere 4'erli olarak yerleştirildi. Tüm hayvanlar aynı şartlarda 12 saat gündüz 12 saat gece olacak şekilde sabit oda sıcaklığında (25° C) muhafaza edildi. Standart rat yemi ve su ile ad libitum beslenme sağlandı.

#### 3.2. Deney Grupları

Çalışmaya alınan hayvanlar 4 farklı gruba ayrıldı:

- **Sağlıklı Grup (SK):** (n=8) Sağlıklı Grup
- **Deneysel Periodontitis Grubu (DPK):** (n=7) Deneysel periodontitis oluşturulup sadece taşıyıcı (distile su) ile gavaj uygulanacak grup.
- **Düşük Doz Bitki Ekstresi Grubu (DP400):** (n=8) Deneysel periodontitis oluşturulup 400 mg/kg dozunda gavaj yolu ile bitki ekstresi uygulanacak grup.
- **Yüksek Doz Bitki Ekstresi Grubu (DP800):** (n=8) Deneysel periodontitis oluşturulup 800 mg/kg dozunda gavaj yolu ile bitki ekstresi uygulanacak grup (Şekil 3.1).

### 3.3. Çalışma Planı



Şekil 3.1. Deney akış şeması

### 3.4. Deneysel Periodontitis Oluşturulması

Hayvanlar Ketamin (90 mg/kg i.p.) (Ketalar, Pfizer), Ksilazin Klorit (10 mg/kg i.p.) (Rompun, Bayer) enjeksiyonu ile genel anesteziye alındı. Hayvanlar düz zemin üzerinde başlarını sabit tutacak mekanizmaya (Şekil 3.2) yerleştirildikten sonra plak birikimini sağlaması için hayvanların üst çene sağ 2. molar dişlerine 4-0 ipek sütür (Dogsan, Türkiye) subgingival bölgede kalacak şekilde yerleştirildi. Düğüm kısmı dişlerin mezio-bukkalinde kalacak şekilde ayarlandı (Şekil 3.3).



Şekil 3.2. Ağız açıklığının sağlanması



**Şekil 3.3.** 2. molar dişe ligatür uygulanması

### **3.5. *P. eurycarpa* Ekstresinin Hazırlanması ve Oral Gavaj İle Uygulanması**

*P. eurycarpa* bitki yaprakları uygun zamanda toplanarak gölgede kurutuldu. Kurutulan bitki kısımları bitki öğütücüsü ile öğütüldü. Ardından bitkide bulunan maddelerin geniş bir çözünürlük aralığı içerisinde ekstreye geçebilmesi için öğütülmüş bitki materyali 24 saat mekanik karıştırıcı yardımıyla %80 oranında etanol ile masere edildi. 24 saatin sonunda ekstre süzülerek rotavaporda 45 °C'yi geçmeyen sıcaklıkla yoğunlaştırıldı. Elde edilen materyal üzerine metanol ilave edilerek 24 saat mekanik karıştırıcı ile maserasyon işlemi tekrarlandı. Bu işlemin 8 kere tekrarlanması ile ekstraksiyon işlemine son verildi. Elde edilen ekstre her seferinde rotavaporda aynı şartlarda yoğunlaştırıldı. Bu işlemler sonunda elde edilen ana ekstre rotavaporda daha fazla yoğunlaşmayana kadar uçuruldu ve deneyde kullanılana kadar buzdolabında muhafaza edildi (Tablo 3.1).



**Tablo 3.1.** *P. eurycarpa* esansiyel yağı gaz kromatografi-kütle spektrometri analizi (212).

Retansiyon süresi	Pik numarası	Kovats indeksi	Alan %	Kimyasal Bileşenler
4.641	1	926	0.63	Trisiklen
4.938	2	939	79.76	$\alpha$ -pinen
5.034	3	953	2.57	Kamfen
5.292	4	977	1.31	Sabinen
5.357	5	980	4.61	$\beta$ -Pinen
5.490	6	990	1.07	$\beta$ -Mirsen
5.613	7	1005	0.16	$\alpha$ -Fellandren
5.658	8	1010	0.12	2-Karen
5.727	9	1022	0.73	3-Karen
5.821	10	1029	0.12	p-Simen
5.914	11	1026	0.40	$\alpha$ -Terpinen
5.973	12	1039	2.13	D-Limonen
6.309	13	1062	0.07	$\gamma$ -Terpinen
6.626	14	1091	1.16	$\gamma$ -Terpinolen
6.772	15	1098	0.09	Linalol
7.081	16	1110	0.20	$\alpha$ -Kamfenol
7.256	17	1139	0.34	trans-Pinokarveol
7.301	18	1153	0.45	Pinokarvon
7.392	19	1165	0.09	Borneol
7.568	20	1177	0.09	Terpinen-4-ol
7.660	21	1285	0.17	Bornil asetat
7.737	22	1295	1.17	Timol
7.825	23	1305	0.17	Karvakrol
8.684	24	1400	0.84	Tetradekan
8.844	25	1471	0.08	Asetik Asit
9.000	26	2000	1.04	İkozan
9.714	27	2649	0.31	Fitalik Asit

Ligatür bağlandıktan sonra her bir hayvanın ağırlığı ölçüldü. Hayvanların ortalama ağırlıklarına göre düşük doz (400 mg/kg) ve yüksek doz (800 mg/kg) deney gruplarına uygulanması gereken ekstre miktarı mg cinsinden hesaplandı. Daha sonra her bir grup için gereken toplam ekstre miktarı hesaplandı ve bir birim fazla olacak şekilde hassas tartı (Ohaus Pioneer, ABD) ile ölçüldü (Şekil 3.4a). Her bir hayvana gavaj ile verilecek miktar 2 ml olarak belirlendi. Gruptaki hayvan sayısı 8 olduğu için bir birim fazlalık ile birlikte toplam hacim 18 ml olacak şekilde ekstre ile distile su vortex cihazı yardımı ile (Velp Scientifica, İtalya) karıştırıldı (Şekil 3.4b). Bu karışım 2 ml'lik enjektörlere alındı ve gavaj yolu ile uygulandı. 1. grup ve 2. gruptaki hayvanlara ise sadece 2 ml distile su verildi.



**Şekil 3.4.** a) Hassas terazi b) Vortex cihazı

### 3.6. Hayvanların Sakrifiye Edilmesi ve Doku Örneklerinin Alınması

Deneyin 15. Gününde tüm hayvanlar yüksek doz anestezi uygulaması (180 mg/kg ketamin, 20 mg/kg ksilazin ile sakrifiye edildi. Ardından hayvanlara maksillektomi işlemi yapıldı. 2. maksiller azı dişi çevresindeki yumuşak dokular eksize edildi ve alüminyum folyoya sarılarak  $-80^{\circ}\text{C}$  derin dondurucuya (Nuair's Glacier, ABD) yerleştirildi (Şekil 3.5). Maksilla blokları ise mikro tomografi görüntüleri için transfer edileceği süre boyunca %10'luk formaldehit solüsyonunda bekletildi.



**Şekil 3.5.**  $-80^{\circ}\text{C}$  derin dondurucu

### **3.7. Biyokimyasal Analizler**

Deneklerden alınan dişeti dokusu örnekleri ölçümler yapılana kadar -80°C derin dondurucuda (Nuair's Glacier, ABD) bekletildi. GSH-Px, SOD, MDA, IL-1 $\beta$ , IL-10, TAS ve TOS parametreleri için biyokimyasal analizlerin yapılmadan önce dokular çözdürüldü ve her parametre için uygun kit kullanılarak analizler tamamlandı.

#### **3.7.1. Dokuların Biyokimyasal Analizlere Hazırlanması**

Dişeti dokuları derin dondurucudan çıkarılıp çözünmesi beklendikten sonra dokuların %10'luk homojenatlarını oluşturmak için dokulara gereken miktarlarda fosfat tamponu ilave edildi. Doku homojenatları +4° C'de, 4000 rpm'de 25 dakika santrifüj edilerek süpernatantlar elde edildi (Şekil 3.6a, Şekil 3.6b). Biyokimyasal analizlerin tümü süpernatantta gerçekleştirildi.

#### **3.7.2. GSH-Px, SOD, MDA, IL-1B, IL-10 Düzeylerinin Ölçümü**

Biyokimyasal analizler için ticari olarak temin edilen Rat ELISA kitleri (Sunredbio Tech. Co., Ltd, Shanghai, Çin) kullanıldı. Kitlerde bulunan yönergelere uygun olacak şekilde dokular hazırlandı. Elde edilen numuneler, mikropılaka okuyucu (BioTek Synergy H1, BioTek Instruments) ile okundu ve veri analiz programı (Gen5, BioTek Instruments) ile değerlendirmeler yapıldı (Şekil 3.6c). Analiz sonuçları standartlar kullanılarak elde edilen kalibrasyon eğrisi ile hesaplandı.

#### **3.7.3. ELISA Kit Prosedürü**

Standart çözeltiler için ayrılan kuyucuklara 50  $\mu$ l standart, numunelerin uygulanacağı kuyucuklara ise 40  $\mu$ l numune ve 10  $\mu$ l biotin ile konjuge ilgili parametreye karşı spesifik antikor ilave edildi. Ardından tüm kuyucuklara 50  $\mu$ l Streptavidin bağı HRP enzimi ilave edilip mikropılakanın üstü kapatılarak 1 saat 37°C sıcaklıkta inkübe edildi. Bu sürenin sonunda kuyucuklar boşaltıldı ve her birine 300  $\mu$ l yıkama tamponu ilave edilerek 3 kez yıkama yapıldı. Tüm kuyucuklara 50  $\mu$ l Substrat A ve 50  $\mu$ l Substrat B çözeltisi eklendi ve 37°C sıcaklıkta 10-15 dakika bekletilerek mavi renk oluşumu sağlandı. Ardından her bir kuyucuğa 50  $\mu$ l durdurma çözeltisi eklendi ve meydana gelen sarı rengin absorbansı 450 nm dalga boyunda okundu.

#### **3.7.4. Total Oksidatif Seviye (TOS) Ölçümü**

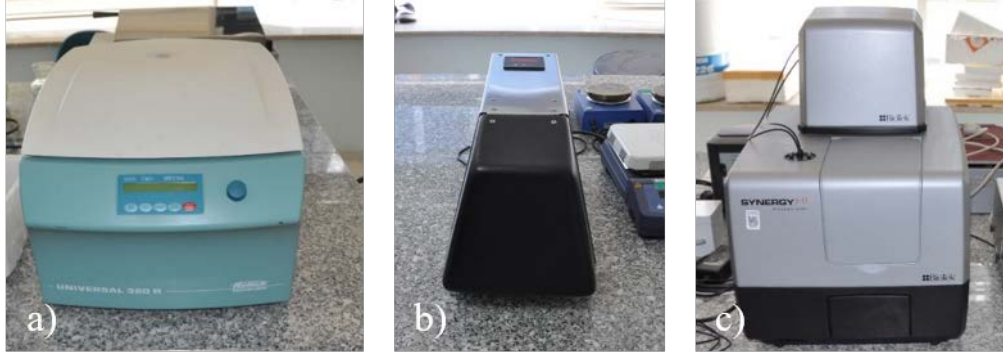
Total oksidan kapasitenin ölçümünde, ticari TOS ölçüm kiti (RelAssay Diagnostic, Türkiye) kullanıldı. Yöntemin prensibinde, örnekteki oksidanlar ferröz iyon-şelatör kompleksini ferrik iyonlara okside etmektedir ve reaksiyon medyumunda bulunan güçlendirici moleküller tarafından oksidasyon reaksiyonu uzatılmaktadır. Oluşan ferrik iyonlar asidik ortamda kromojen madde ile etkileşerek renk oluşumunu sağlamaktadır (213). TOS ölçümü kitteki rehberine uygun şekilde yapıldı. ELISA 25 °C'ye ayarlandı, 500 µL reaktif 1 (ölçüm tamponu) ve 75 µL serum karıştırıldı ve 530 nm'de absorbans ölçümü yapıldı. Daha sonra karışıma 25 µL reaktif 2 (pro-kromojen solüsyon) eklendi ve 10 dk. İnkübasyonun ardından tekrar 530 nm'de ölçülen absorbans değerleriyle TOS düzeyleri belirlendi. Kitten elde edilen değerler hidrojen peroksit ile kalibre edilmiş olup, elde edilen sonuçlar litre başına mikromolar hidrojen peroksit eşdeğeri seviyesini belirtmektedir.

#### **3.7.5. Total Antioksidan Seviye (TAS) Ölçümü**

Total antioksidan kapasitenin ölçümünde TAS ölçüm kiti (RelAssay Diagnostic, Türkiye) kullanıldı. Yöntem prensip olarak, örnekteki antioksidan bileşenlerin, koyu mavi-yeşil renkli 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit (ABTS) radikalini, renksiz ABTS formuna indirgemesine dayanır (214). Ayrıca kit Trolox eşdeğeri olarak isimlendirilen stabil antioksidan standart solüsyonu ile kalibre edilmiştir. TAS ölçümü kitteki rehberine uygun şekilde yapıldı. ELISA cihazı 25 °C'ye ayarlandı, 500 µL reaktif 1 (ölçüm tamponu) ve 30 µL serum karıştırılıp 660 nm'de absorbans ölçümü yapıldı. Karışıma 75 µL reaktif 2 (renkli ABTS solüsyonu) eklendi ve 10 dk. İnkübasyonun ardından tekrar 660 nm'de absorbans ölçülmesiyle TAS düzeyleri belirlendi.

Oksidatif Stres İndeksi (OSI) değeri ise aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

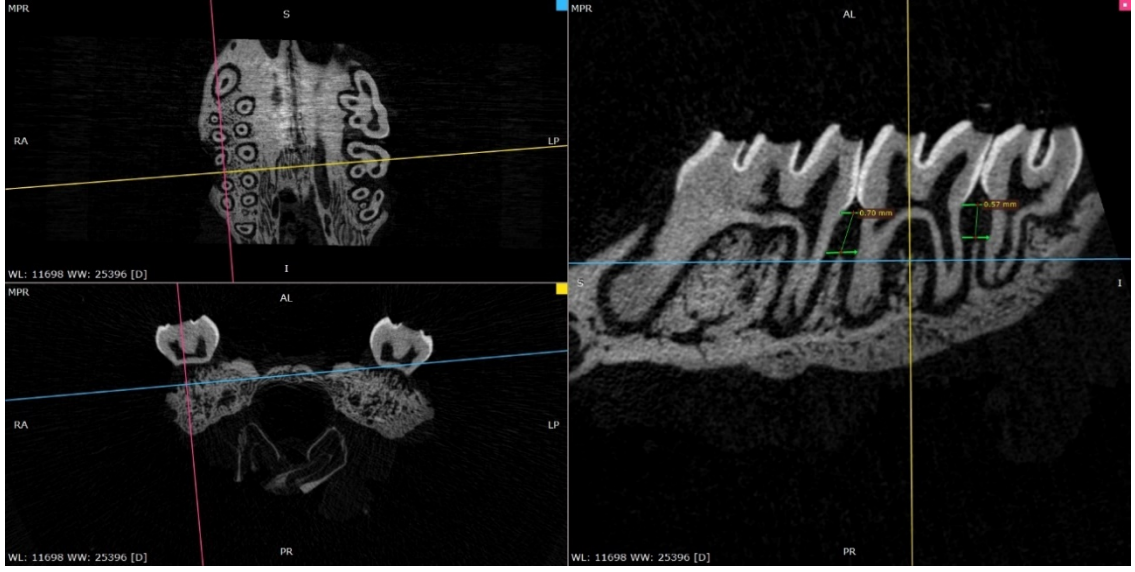
$$OSI = \frac{TOS \text{ (mikromol H}_2\text{O}_2 \text{ Eqv / litre)}}{TAS \text{ (milimol Trolox Eqv / litre)}}$$



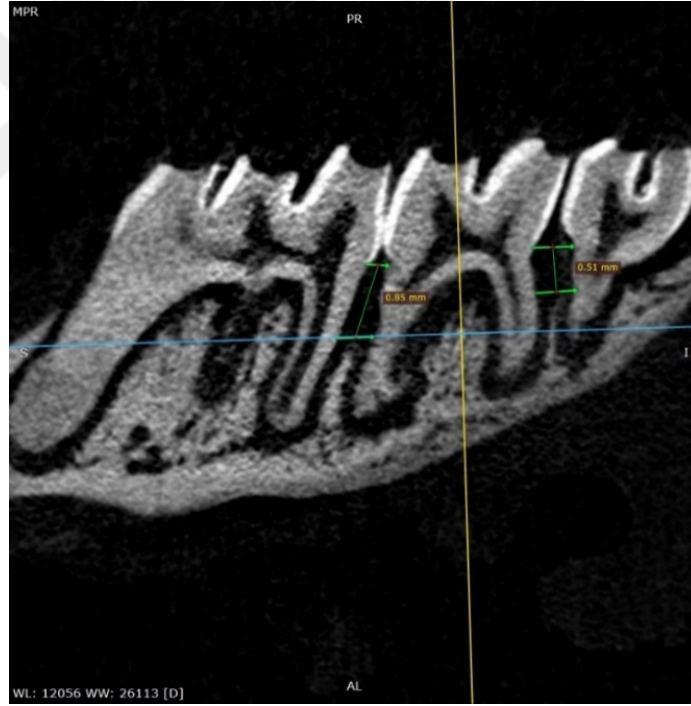
**Şekil 3.6.** Biyokimyasal analiz için kullanılan cihazlar. a) santrifüj cihazı (Hettich, Almanya) b) Homojenat hazırlayıcı (Biospec, ABD) c) mikroploka okuyucu (Synergy microplate reader, ABD)

### 3.8. Mikro Bilgisayarlı Tomografi İncelemelerinin Yapılması

Alınan maksilla blokları 1 cm x 1 cm boyutunda hazırlanarak görüntüleme işlemleri mikro bilgisayarlı tomografi (Mikro-BT) cihazı (Skyscan 1272, Belçika) ile yapıldı. Görüntüler DICOM formatında alındı ve RadiAnt DICOM Viewer (Medixant, Polonya) programı yardımıyla görüntüler incelendi. Programın 3 boyutlu düzlemde görüntüleme özelliği kullanılarak ölçümler 3 boyutlu ortamda hizalanarak yapıldı (Şekil 3.7). Ölçümler Dişlerin mine sement sınırları birleştirilerek bir çizgi oluşturuldu. Aynı şekilde bu seviyeden apikale doğru ilerlendiğindeki ilk kemik temasının olduğu kısımda da ikinci bir çizgi oluşturuldu. Bu iki çizgi arasındaki mesafe ölçülerek kemik kaybı belirlendi (Şekil 3.8). 2. molar dişin mezial ve distal interproksimal bölgesindeki kemik kaybı miktarı hem bukkal hem palatinal bölgeden yukarıda bahsedilen şekilde ölçüldü. Yapılan ölçümler kaydedildikten sonra mezio-bukkal ve mezio-palatinal, aynı şekilde distobukkal ve distopalatinal ölçümlerin ortalamaları alınarak mezial bölge ve distal bölge için birer veri elde edildi.



Şekil 3.7. 3 boyutlu düzlemde görüntülerin incelenmesi



Şekil 3.8. Alveolar kemik kaybı ölçümlerinin yapılması

### 3.9. Verilerin İstatistiksel Analizi

Çalışmanın güç analizi Kara ve arkadaşlarının üzüm çekirdeği ekstratı ile yaptıkları deneysel periodontitis çalışmasındaki alveolar kemik kaybı parametresi standart sapma değerleri ile  $\alpha=0,05$ ,  $1-\beta(\text{güç}) = 0,95$  alındığında “etki büyüklüğü  $f=0.9356725$ ”, “ $\alpha=0,05$ ”, “Noncentrality Parametresi  $\lambda = 21.011$ ”, “F Kritik = 3,0983”,

“Numerator df = 3”, “Denominator df = 20” değerleri ile gerçek güç değeri % 95.02 olarak hesaplanmıştır (215).

Analizler IBM SPSS Statistics 20 (ABD) analiz programı ile gerçekleştirildi. Veriler ortalama, standart sapma, medyan, minimum, maksimum, yüzde ve sayı olarak sunuldu. Sürekli değişkenlerin normal dağılımının incelenmesi Shapiro Wilk-W testi ile yapıldı. İki den fazla bağımsız grup ile sürekli değişkenlerin kıyaslanması işlemi için verilerin normal dağılım gösterdiğinde ANOVA testi, veriler normal dağılım göstermediğinde ise Kruskal Wallis testi kullanıldı. ANOVA testi sonrası post-hoc testler varyansların homojen olması koşulu sağlandığında Tukey testi ile varyanslar homojen olma koşulu sağlanmadığında ise Tamhane’s T2 testi kullanılarak yapıldı. Kruskal Wallis testi sonrası post-hoc testlerde ise Kruskal Wallis 1-way ANOVA (k samples) testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi  $p < 0.05$  olarak alındı.

## 4. BULGULAR

Deneyin yürütülmesi aşamasında deneysel periodontitis kontrol grubundan (DPK) 1 adet denek kaybedildi. Bu kayıp dışında deney sorunsuz bir şekilde tamamlandı.

### 4.1. Biyokimyasal Sonuçlar

#### 4.1.1. IL-1 $\beta$ ve IL-10 Seviyeleri

Doku IL-1 $\beta$  ve IL-10 seviyeleri Tablo 4.1'de verilmiştir. Buna göre IL-1 $\beta$  seviyeleri tüm deneysel periodontitis gruplarında sağlıklı kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Fakat istatistiksel olarak anlamlı sonuç sadece SK ve DP400 grupları arasında elde edilmiştir ( $p<0.05$ ). DP400 ve DP800 gruplarının ortalama değerlerinin DPK grubuna göre düşük olarak gözlemlense de istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadığı gözlemlendi ( $p>0.05$ ) (Şekil 4.1).

Doku IL-10 değerleri en yüksek DPK grubunda gözlemlendi fakat, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ( $p>0.05$ ) (Şekil 4.2).

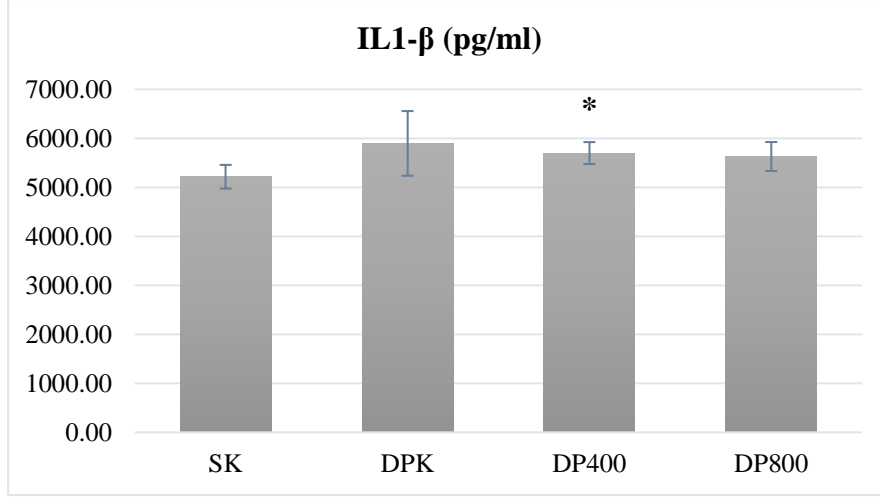
**Tablo 4.1. Gruplar arasında IL-1 $\beta$  ve IL-10 değerlerinin karşılaştırılması**

	SK (n=8)	DPK (n=7)	DP400 (n=8)	DP800 (n=8)	p
	Ort $\pm$ SS	Ort $\pm$ SS	Ort $\pm$ SS	Ort $\pm$ SS	
<b>IL-1<math>\beta</math></b> <b>(pg/ml)</b>	5216,00 $\pm$ 241,43	5895.97 $\pm$ 659.77	5698,96 $\pm$ 223,86 <sup>a</sup>	5628,11 $\pm$ 296,07	0.014*
<b>IL-10</b> <b>(pg/ml)</b>	428,01 $\pm$ 53,93	456.40 $\pm$ 37.10	410,40 $\pm$ 36,08	404,25 $\pm$ 18,32	0.065

*One Way ANOVA Test (Welch's)*

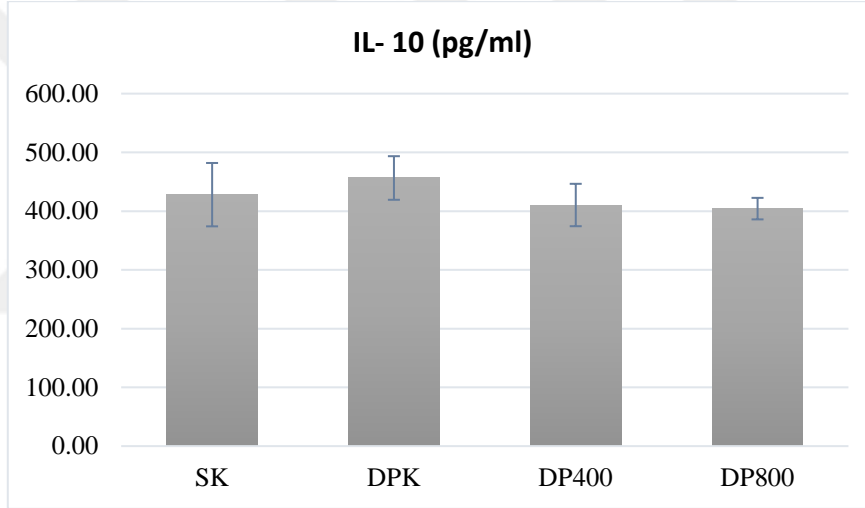
SK: Sağlıklı Grup, DPK: Deneysel Periodontitis Grubu, DP400: Düşük Doz Bitki Ekstresi Grubu, DP800: Yüksek Doz Bitki Ekstresi Grubu, Ort: Ortalama, SS: Standart Sapma,  $p<0.05$ : istatistiksel anlamlılık, a: SK'ye göre farklılık





**Şekil 4.1. Dişeti dokusu IL1-β seviyeleri**

*One Way ANOVA Testi (Welch's), \*: SK grubuna göre anlamlılık, p<0.05*



**Şekil 4.2. Dişeti dokusu IL-10 seviyeleri**

#### 4.1.2. GSH-Px, MDA ve SOD Seviyeleri

Doku GSH-Px, MDA ve SOD analizleri Tablo 4.2'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre grupların GSH-Px değerleri arasında anlamlı fark bulunamadı ( $p>0.05$ ) (Şekil 4.3).

Doku MDA değerleri incelendiğinde en düşük değerler SK grubunda bulunmaktadır. DP400 grubu değerlerinin ise DPK grubuna göre düşük olduğu gözlemlendi. Fakat bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ( $p>0.05$ ) (Şekil 4.4).

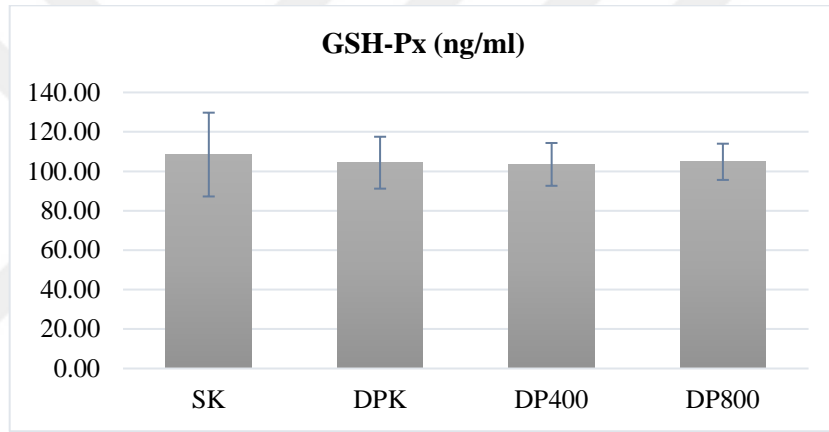
Dişeti dokusunda ölçülen SOD miktarları açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunamadı. DPK grubu ile DP800 grubu arasında fark gözlemlense de ( $p=0.056$ ), bu fark istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşmadı ( $p>0.05$ ) (Şekil 4.5).

**Tablo 4.2. Gruplar arasında GSH-Px, MDA, SOD değerlerinin karşılaştırılması**

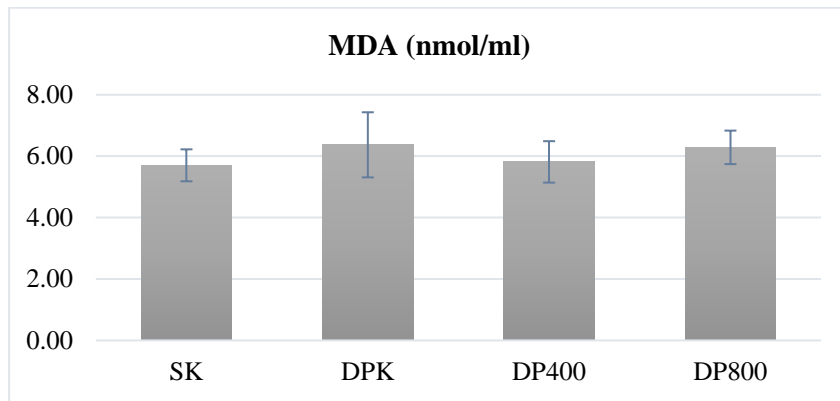
	SK (n=8)	DPK (n=7)	DP400 (n=8)	DP800 (n=8)	p
	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	
<b>GSH-Px</b> (ng/ml)	108.49±21.25	104.37±13.16	103.51±10.86	104.82±9.19	0.906
<b>MDA</b> (nmol/ml)	5.70±0.52	6.37±1.06	5.81±0.67	6.29±0.55	0.197
<b>SOD</b> (ng/ml)	63.83±10.87	57.43±6.65	62.74±3.14	67.97±5.74	0.065

*One Way ANOVA Testi*

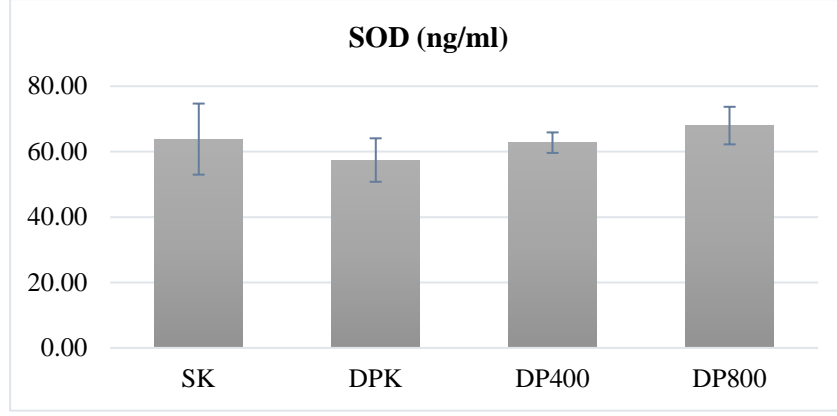
SK: Sağlıklı Grup, DPK: Deneysel Periodontitis Grubu, DP400: Düşük Doz Bitki Ekstresi Grubu, DP800: Yüksek Doz Bitki Ekstresi Grubu, Ort: Ortalama, SS: Standart Sapma, p<0.05: istatistiksel anlamlılık,



**Şekil 4.3. Dişeti dokusu GSH-Px seviyeleri**



**Şekil 4.4. Dişeti dokusu MDA seviyeleri**



**Şekil 4.5. Dişeti dokusu SOD değerleri**

#### 4.1.3. TOS, TAS ve OSI Seviyeleri

Dişeti dokusu TOS, TAS ve OSI değerleri Tablo 4.3’de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre TOS değerleri açısından SK grubu, DPK ve DP gruplarından anlamlı olarak farklı bulundu ( $p<0.05$ ) (Şekil 4.6).

Dokulardaki TAS değerleri incelendiğinde en yüksek değerler SK grubunda gözlemlendi (Şekil 4.7). SK ve DP400 grupları arasında ise anlamlı farklılık bulundu ( $p<0.05$ ).

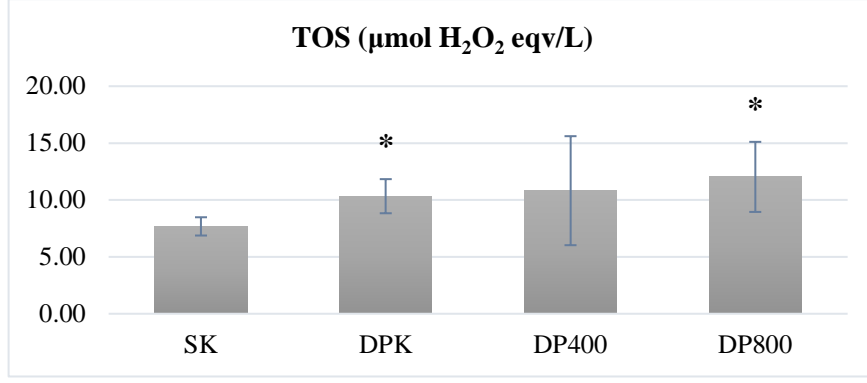
TAS ve TOS değerleri oranlanarak elde edilen OSI değerleri incelendiğinde SK grubu ile DPK ve DP800 grupları arasında anlamlı fark bulunmuştur ( $p<0.05$ ) (Şekil 4.8).

**Tablo 4.3. Gruplar arasında TOS, TAS ve OSI değerlerinin karşılaştırılması**

	SK (n=8)	DPK (n=7)	DP400 (n=8)	DP800 (n=8)	p
	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	
<b>TOS</b>	7.68±0.80	10.39±1.61 <sup>a</sup>	10.82±4.79	12.03±3.08 <sup>a</sup>	0.002**
<b>TAS</b>	4.38±0.45 <sup>b</sup>	3.74±0.17	3.71±0.60	3.91±0.62	0.050*
<b>OSI</b>	1.78±0.32	2.79±0.47 <sup>c</sup>	2.97±1.27	3.09±0.68 <sup>c</sup>	0.010*

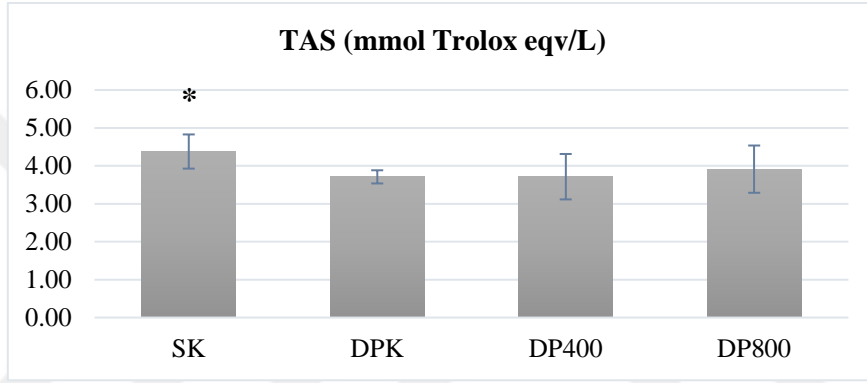
\*One Way ANOVA Test (Welch’s), \*\*Kruskal Wallis Testi

SK: Sağlıklı Grup, DPK: Deneysel Periodontitis Grubu, DP400: Düşük Doz Bitki Ekstresi Grubu, DP800: Yüksek Doz Bitki Ekstresi Grubu, Ort: Ortalama, SS: Standart Sapma,  $p<0.05$ : istatistiksel anlamlılık, a: SK’ye göre anlamlılık, b: DPK’ye göre anlamlılık, c: SK’ye göre anlamlılık



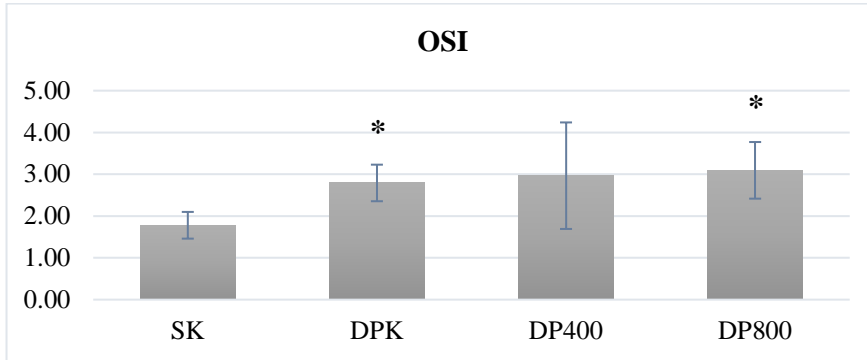
**Şekil 4.6. Dişeti dokusu TOS değerleri**

*Kruskal Wallis Testi, \*: SK'ye göre anlamlılık*



**Şekil 4.7. Dişeti dokusu TAS değerleri**

*One Way ANOVA Testi, \*: DPK'ye göre anlamlılık*



**Şekil 4.8. Dişeti dokusu OSI seviyeleri**

*One Way ANOVA Testi, \*: SK'ye göre anlamlılık*

## 4.2. Mikro BT Ölçümleri

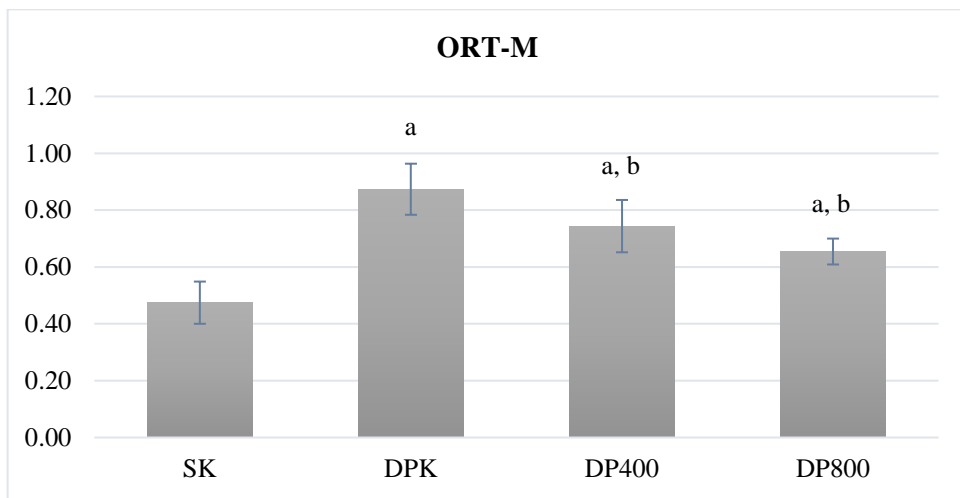
Sıçanların maksillalarında yapılan mikro BT ölçümleri Tablo 4.4’de verilmiştir. Bu sonuçlara göre 2. molar dişlerin mezial bölgelerinde yapılan ölçümlerde SK grubu tüm gruplardan istatistiksel olarak anlamlı fark göstermiştir. Buna ek olarak DPK grubu, DP400 ve DP800 gruplarından anlamlı olarak farklılık göstermiştir ( $p<0.05$ ). Distal bölgeden yapılan ölçümlerde ise SK grubu diğer tüm gruplardan istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık göstermiştir. Buna ek olarak DPK grubu ile DP800 grubu arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark mevcuttur ( $p<0.05$ ).

**Tablo 4.4. Mikro-BT üzerinde yapılan kemik kaybı ölçüm değerleri**

	SK (n=8)	DPK (n=7)	DP400 (n=8)	DP800 (n=8)	p
	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	
<b>ORT-M</b>	0.47±0.07	0.87±0.09 <sup>a</sup>	0.74±0.09 <sup>a,b</sup>	0.65±0.05 <sup>a,b</sup>	0.000*
<b>ORT-D</b>	0.28±0.05	0.66±0.13 <sup>a</sup>	0.57±0.09 <sup>a</sup>	0.47±0.05 <sup>a,b</sup>	0.000*

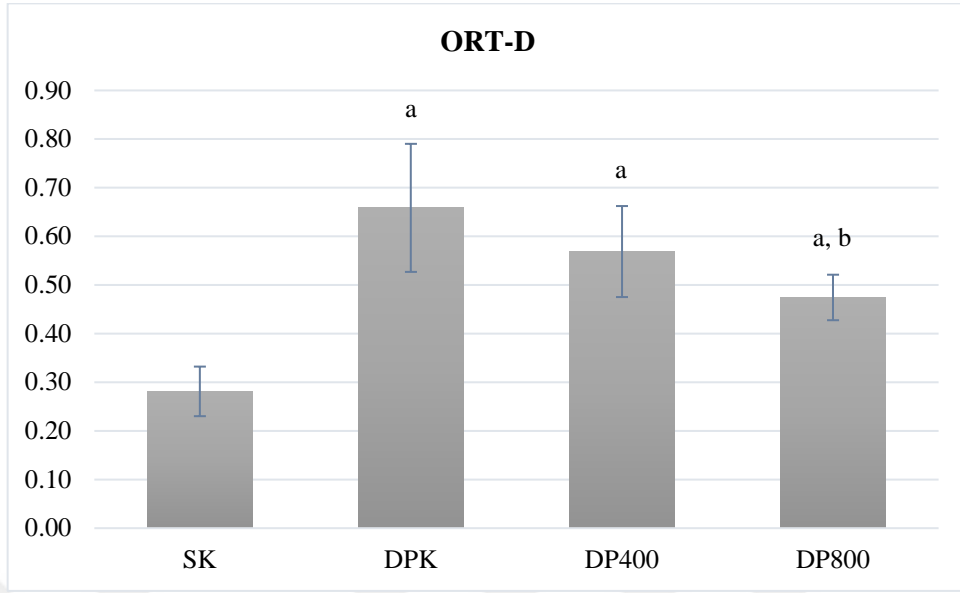
\*One Way ANOVA Testi

ORT-M: Mezial bölge ölçüm ortalaması, ORT-D: Distal bölge ölçüm ortalaması, SK: Sağlıklı Grup, DPK: Deneysel Periodontitis Grubu, DP400: Düşük Doz Bitki Ekstresi Grubu, DP800: Yüksek Doz Bitki Ekstresi Grubu, Ort: Ortalama, SS: Standart Sapma,  $p<0.05$ : istatistiksel anlamlılık, a: SK’ye göre anlamlı farklılık, b: DPK’ye göre anlamlı farklılık



**Şekil 4.9. Mikro-BT ORT-M seviyeleri**

One Way ANOVA Testi, a: SK’ye göre anlamlılık, b: DPK’ye göre anlamlılık



**Şekil 4.10. Mikro-BT ORT-D seviyeleri**

*One Way ANOVA Testi, a: SK'ye göre anlamlılık, b: DPK'ye göre anlamlılık*

## 5. TARTIŞMA

Bu çalışmada *P. eurycarpa* bitki ekstresi uygulamasının ratlarda oluşturulan deneysel periodontitis üzerine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda deneysel periodontitis sonucunda meydana gelen alveolar kemik kaybı ve dokulardaki biyokimyasal değişiklikler (IL-1 $\beta$ , IL-10, GSH-Px, SOD, MDA, TAS, TOS, OSI) değerlendirilmiştir.

Periodontal hastalıklar tüm dünyada büyük bir halk sağlığı problemi olarak değerlendirilmektedir (216,217). Hastalığın agresif formu yetişkin popülasyonun % 11'ini etkilerken, genel periodontal hastalıklar olarak popülasyonun % 50'den fazlasını etkilemektedir ve bu da periodontitisi global kronik hastalık yükünü arttıran en önemli ağız hastalıklarından biri yapmaktadır. Periodontitis bireylerin ağız sağlığı ile ilişkili hayat kalitesini de düşürmektedir (218). Bunlara ek olarak periodontitisin kardiyovasküler komplikasyonlar, romatoid artrit, diyabet, metabolik sendrom gibi sistemik problemlerle de ilişkili olduğu bulunmuştur (202,218,219).

Periodontitis başlangıcı ve ilerlemesi subgingival biyofilm birikimi ve buna karşı konağın verdiği enflamatuvar yanıt ile ilişkilidir. Biyofilm genellikle gram negatif anaerobik kommensal mikrobiyota içerdiği gibi *P. gingivalis* gibi fırsatçı patojen mikroorganizmalar da içermektedir (220). PMNL periodontal patojenlere yanıt olarak ROT, proteinazlar gibi doku yıkımında rol oynayan faktörler salgılamaktadır (202). Bu moleküller dişeti dokusu ve periodontal ligament üzerinde oksidatif hasara neden olmakta ve bunun sonucunda osteoklastik kemik rezorpsiyonu ortaya çıkmaktadır (221,222). Salgılanan bu ajanlar ayrıca hastalığın ilerlemesine katkıda bulunan IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  gibi pro-enflamatuvar sitokinlerin salgılanmasını indükler. Bu süreç alveolar kemiğin rezorpsiyonuna ve devamında da diş kaybına neden olur (212,223,224).

Hayvan araştırmalarının insanlardaki hastalıkların araştırılmasına sağladığı katkı konusunda görüş ayrılıkları mevcuttur. Her şeyden önce hayvan çalışmalarından ne kadar veri sağlansa da hayvandaki hastalık sürecinin insan ile birebir aynı olması mümkün değildir. Hayvan verileri biyolojik uygulamaların insanlar üzerinde kullanılmadan önce test edilmesinde fayda sağlamaktadır (225). Buna karşın periodontal hastalıklar üzerine yapılan klinik araştırmalarda bireylerin hastalığa yatkınlığı, risk faktörleri gibi özelliklerinin farklı olmasından dolayı çalışma sonuçlarında çelişkiler ortaya çıkabilmektedir (226).

Deneysel periodontitis çalışmalarında primatlar, mini domuzlar, köpekler, ratlar ve fareler kullanılmaktadır (202). Primatlar insanlara filogenetik olarak yakın oldukları için oral yapıları insanlar ile benzerdir. Periodontitis oluşumu bazı primatlarda doğal olarak gerçekleşmektedir. Fakat primatları elde etmek oldukça zordur ve maliyetleri diğer hayvan modellerine göre yüksektir (193). Bunlara ek olarak primatlar tüberküloz gibi enfeksiyöz hastalıklara karşı duyarlıdır (200). Köpekler maliyet olarak primatlardan uygundur fakat diş yapıları insanlardan farklılık göstermektedir. Gingival sulkus ve dişeti oluşu sıvısı köpeklerde sağlık durumunda bulunmamaktadır ve dıştaşı kompozisyonu da insandan farklıdır (199). Bunlara ek olarak günlük eşlik edilmesi, egzersiz alanı ve bakımlarının sağlanması gibi zorluklar nedeniyle köpekler çok tercih edilmemektedir (202). Tavşanlarda bulunan oral mikroorganizmalar insanlar ile benzerlik göstermektedir (227). Fakat periodontal defektlerin cerrahi olarak oluşturulması ve sonrasında periodontal rejenerasyon tedavilerinin uygulanması şeklinde yapılan bir çalışmada periodontal ligament rejenerasyonunun tavşan modelleri için uygun olmadığı belirtilmiştir (228). Ratların molar bölge anatomisi insanlar ile benzerlik göstermektedir, fakat dişeti oluşu epiteli keratinize olduğu için ratlar insanlara göre periodontal hastalığa karşı daha dirençlidir. Buna karşın periodontal hastalık oluşumunun uyarılması ile birlikte periodontal hasar kısa süre içinde gerçekleşir (229). İnsanlara benzer olarak *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* gibi patojenlerin ratlarda da periodontal hastalığa sebep olduğu gösterilmiştir (202,230). Ayrıca ratların üretim ve bakım maliyetleri düşük olup yönetimleri ve bakımları kolaydır. Bu nedenlerle ratlar deneysel periodontitis modellerinde sıklıkla kullanılmaktadır (231). Ratlar arasında ise *Sprague dawley* ve *Wistar albino* türleri daha çok tercih edilmektedir (232).

Dişi ratlarda östrojen seviyeleri menstrual siklus boyunca değişiklik göstermektedir (233). Ooferektomi yapılan ratlarda östrojen seviyesinde azalmaya bağlı olarak kemik kütlelerinde azalma gözlemlendiği bildirilmiştir (234,235). Bir çalışmada ooferektomi sonrası ratlarda azalma gösteren östrojenin yerine koyulması ile birlikte kemik kütlelerinde düzelme sağlandığı gözlemlenmiştir (236). Shors ve arkadaşları ise ratlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada akut strese maruz bırakılan ratlarda östrojen seviyelerinin artış gösterdiğini gözlemlemiştir (237). Bu nedenle çalışmamızda hormon seviyesindeki değişikliklerden etkilenmemek için erkek ratlar tercih edilmiştir(238).



Ratlarda deneysel periodontitis oluşturmak için ligatür bağlama, lipopolisakkarit enjeksiyonu, *A. actinomycetemcomitans* inokülasyonu, periodontal patojenlerin oral gavaj ile uygulanması yöntemleri kullanılmaktadır (239). *A. actinomycetemcomitans* rat bukkal epiteline yapışır ve pirinç ratlarında yaygın olarak bulunur. Fakat ticari kaynaklardan elde edilen ratlarda doğal olarak bulunması yaygın değildir. Buna rağmen *A. actinomycetemcomitans* sonradan kolonize olabilir. Fakat rat oral florasında doğal olarak bulunan mikroorganizmaların A.a kolonizasyonunu etkilemesini önlemek için bu mikroorganizmaları azaltıcı önlemler alınması gerekmektedir (239). Lipopolisakkarit enjeksiyonunda ise palatinal dişeti bölgesine *P. gingivalis* lipopolisakkarit (Pg-LPS) enjeksiyonu yapılmaktadır. Mustafa ve ark. rat ile yaptıkları bir çalışmada haftada iki defa 10 µg Pg-LPS enjeksiyonu sonrasında 14-30 gün süresinde enflamasyon gözlendiğini fakat alveolar kemik kaybı gözlenmediğini belirtmiştir (240). Cirelli ve ark. ise haftada 3 defa 10 µg Pg-LPS uygulaması ile 4 haftada kemik kaybı gözlendiğini rapor etmiştir (241). Ligatür yerleştirilmesi yöntemi ile epitelin apikale göçü ve kemik kaybı gibi periodontitisin klinik görüntüsü taklit edilebilmektedir. Maksiller veya mandibular molar dişlere yerleştirilen ipek ligatür hem mekanik travma hem de ligatür lifleri arasında plak birikimi yoluyla periodontitise sebep olur (209). Ligatür ile deneysel periodontitis modelinde periodontal hastalık hayvanda doğal olarak bulunan mikroorganizmalar yolu ile gelişmekte ve PAMPs, toksinler, mikrobiyal metabolizma ürünleri gibi çeşitli virülans faktörleri içermektedir. Bu nedenle bu model ile oluşturulan periodontitisin, tek bir mikroorganizma ile hastalık oluşturulan periodontitis modellerine göre insanlardaki periodontal hastalığa daha fazla benzerlik gösterdiği düşünülmektedir (242). Jeong-Hyon ve ark. yaptıkları derlemede ligatür yerleştirilmesi sonrasında periodontitis oluşumunun 10. günde gerçekleştiğini belirtmiştir. Buna ek olarak aynı derlemede alveolar kemik kaybının ligatür yerleştirilmesinden sonraki 7-10 gün aralığında maksimum olduğu ve kaybın 14. günden sonra azaldığı rapor edilmiştir (231). De Lima ve ark. klorpromazinin deneysel periodontitise etkisini inceledikleri çalışmada ligatür yoluyla deneysel periodontitis oluşturulan kontrol grubunda kemik kaybının 7 ve 11. günlerde maksimum seviyeye ulaştığını ve 14. günden sonra ise kemik kaybının azalma gösterdiğini bildirmiştir (243). Kuhr ve ark. ligatür ile deneysel periodontitis modelini inceledikleri çalışmada 15, 30 ve 60. günlerdeki kemik kaybını incelemiş ve en çok kemik kaybının ilk 15 günde olduğunu rapor etmiştir. Buna bağlı olarak araştırmacılar ligatür ile deneysel periodontitis modeline yönelik çalışmaların 15

günlük süre içerisinde yapılmasını önermiştir (244). Bu çalışmalar doğrultusunda çalışmamızda deneysel periodontitis oluşturulduktan sonra 14 gün boyunca gavaj uygulandı ve 15. günde ratlar sakrifiye edildi.

Periodontitisin geleneksel tedavi yöntemi detertraj ve kök yüzeyi düzleştirme yoluyla mikrobiyal plağın ve diştaşının mekanik temizliğini içermektedir. Bunlara ek olarak bazı hastalarda ek kemoterapötik ilaçlar kullanılması gerekebilmektedir (232). Günümüzde ise birçok hastalığın tedavisinde etkinlikleri kanıtlanan ve daha az yan etki gösterdiği rapor edilen bitkisel ürünlerin kemoterapötik ilaçlar yerine periodontitis tedavisinde kullanımları araştırılmaktadır (245).

Periodontitisin tedavisindeki etkinlikleri incelenmek üzere birçok bitkisel ürün araştırılmıştır (231). Antimikrobiyal ve anti-enflamatuvar özelliklere sahip bitkisel ürünlerin periodontitisin kontrol altına alınmasında ve tedavisinde başarılı olabileceği belirtilmektedir (232,246). Bizim çalışmamızda antibakteriyel, antioksidan ve anti-enflamatuvar özelliklere sahip olan *P. eurycarpa* bitki ekstresinin deneysel periodontitis üzerine etkisi incelenmiştir (182,189,190). Deneklere uygulanacak doz konusunda daha önce yapılmış olan *Pistacia* cinsi bitki ekstrelerinin etkilerine ve toksik dozlarına yönelik çalışmalar rehber alınmıştır. Bu çalışmalardan Mahmoudi ve ark. *P. lentiscus* bitkisinin farelerde 3 g/kg dozuna kadar toksik etki göstermediğini belirtmiştir. Aynı çalışmada ratlarda deney amaçlı kullanılan dozlar ise 200, 400, 600 ve 800 mg/kg olup bitki ekstresinin pati ödeme etkileri incelenmiştir. Gruplar içinde 800 mg/kg dozu uygulanan grupta enflamasyonun önlendiği gözlenmiştir (247). Heidarian ve ark. *P. atlantica* bitki ekstresini ratlar üzerinde 200, 400, 800 mg/kg dozlarında oral olarak uygulamış ve çalışmada ekstrenin anti-enflamatuvar ve antioksidan etkilerini incelemiştir. İncelenen antioksidan parametrelerde en iyi sonuçları 800 mg/kg dozu uygulanan grubun sağladığı rapor edilmiştir. Araştırmacılar *P. atlantica* bitki ekstresinin antioksidan ve anti-enflamatuvar özelliklerinin bu sonuçların sağlanmasında önemli rol oynadığını belirtmektedir (248). Bir başka çalışmada asetik asit ile kolit geliştirilen ratlara 300 ve 600 mg/kg dozlarında *P. atlantica* ekstresi uygulanmış ve iyileşme mikroskopik olarak incelendiğinde bitki ekstresinin enflamasyonu azalttığı ve iyileşmeyi hızlandırdığı rapor edilmiştir. Deney grupları içerisinde doz olarak 600 mg/kg bitki ekstresi verilen grubun daha iyi sonuç verdiği belirtilmiştir (249). *P. eurycarpa* bitkisinin deneysel periodontitis üzerindeki etkisine yönelik tek çalışma ise Azeez ve ark.'nın yaptığı çalışmadır. Bu çalışmada Azeez ve ark. *P. eurycarpa* bitki

ekstresini jel formunda kullanmış ve etkilerini klorheksidin ile karşılaştırmıştır. Enflamatuvar hücre sayısı, RANKL ve IL-1 $\beta$  seviyeleri açısından bitki ekstresi uygulanan grupta diğer gruplardan anlamlı derecede daha düşük sonuçlar elde edildiği rapor edilmiştir. Araştırmacılar bitki ekstrenin RANKL ve IL-1 $\beta$  seviyelerini düşürerek kemik rezorpsiyonunu azalttığını belirtmektedir (212). Bizim çalışmamızda ise bitki ekstresinin gavaj yoluyla uygulanması tercih edilmiştir. Bilgimiz dahilinde literatürde rat deneysel periodontitis modelinde *P. eurycarpa* bitki ekstre sistemik olarak uygulandığı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamızda kullanılacak dozlar *Pistacia* cinsi bitkilerde yapılan bu çalışmalar doğrultusunda 400 mg/kg ve 800 mg/kg olarak belirlenmiştir.

Periodontal kemik kaybında konak yanıtının rolü karmaşıktır. Yetersiz konak yanıtının periodontal yıkımı arttırdığı ve aynı zamanda aşırı konak yanıtının da periodontal hastalığa neden olduğu bilinmektedir (250). Agresif periodontitis hastalarında aşırı makrofaj yanıtı gözlenmekte ve PGE2 ve IL-1 $\beta$  seviyelerine artış gözlenmektedir (251). Silva ve ark. yaptıkları çalışmada aktif periodontal lezyonlarda IL-17 ve RANKL üretiminin arttığını ve IL-10 ve TGF- $\beta$  seviyelerinin azaldığını rapor etmiştir. Aynı çalışmada aktif olmayan (ilerleme göstermeyen) periodontal lezyonlarda IL-10 ve TGF- $\beta$  üretiminin arttığı belirtilmiştir (252). Lökosit fonksiyon antijeni 1 (LFA-1) eksikliği bulunan farelerde nötrofillerin periodonsiyuma geçişi gerçekleşmemektedir, buna ek olarak LFA-1 antagonisti üretiminden sorumlu bir hücre olan gelişimsel endotelyal lokus 1 eksikliği bulunan farelerde ise periodonsiyuma kontrol altına alınamayan nötrofil infiltrasyonu gözlenmiştir (123).

Williams ve ark. prostaglandin inhibitörü bir ilaç ile yaptıkları çalışma, sitokinlerin periodontal yıkım ile ilişkisini gösteren ilk çalışmalardan (250,253). Williams ve ark. bu çalışmada periodontal hastalığa sahip köpeklere flurbiprofen uygulamış ve alveolar kemik rezorpsiyonunun anlamlı derecede azaldığını gözlemlemiştir (253). İnsan olmayan primatlar üzerinde yapılan bir çalışmada IL-1 ve TNF inhibisyonunun periodontal kemik yıkımını ve periodontal ataşman kaybını azalttığı gösterilmiştir (254). İnsanlarda yapılan bir çalışmada periodontal hastalığa sahip bireylerin kemik ve ataşman kaybı gözlenen bölgelerindeki DOS örneklerinde IL-1 $\beta$  seviyesinin artış gösterdiği tespit edilmiştir (255). Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada ise *P. gingivalis* LPS enjeksiyonu sonrası IL-1 reseptör eksikliği bulunan farelerdeki osteoklast üretiminin IL-1 reseptör eksikliği bulunmayan farelere göre daha

az gerçekleştiği gözlenmiştir (256). Ratlarda yapılan bir çalışmada, ligatür ile birlikte ekzojen rekombinant insan IL-1 $\beta$  uygulanan ratlarda kemik yıkımı ve enflamasyon seviyelerinin sadece ligatür uygulanan gruba göre artış gösterdiği rapor edilmiştir (257). Bu çalışmalar IL-1 $\beta$  seviyesinin artmasının periodontal hastalığın şiddetini arttırdığını göstermektedir. Bizim çalışmamızda da deneysel periodontitis oluşturulan gruplarda IL-1 $\beta$  seviyeleri incelendiğinde SK grubu IL-1 $\beta$  seviyesi DP400 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur. SK grubu IL-1 $\beta$  seviyesinin deneysel periodontitis oluşturulan DPK ve DP800 gruplarından istatistiksel olarak anlamlı olmasa da düşük seviyede olduğu gözlenmiştir. Ayrıca DPK grubu ile bitki ekstresi uygulanan gruplar arasında da IL-1 $\beta$  seviyeleri açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bu da bitki ekstresi uygulamasının deney süresince doku IL-1 $\beta$  seviyelerinde anlamlı bir farklılık oluşturmadığını göstermektedir.

IL-10 çoğunlukla T hücrelerinden salgılanmakla birlikte B hücreleri, monositler ve makrofajlar da IL-10 salgılayabilir (5,258). IL-10 immün sistem yanıtını ve enflamatuvar yanıtı IL-1, IL-6, IL-8 ve TNF'yi inhibe ederek baskılamaktadır (5,258,259). Bunlara ek olarak IL-10, matriks metalloproteinaz üretimini ve aktive olan T hücrelerindeki RANKL üretimini de inhibe edebilmektedir (5,76).

IL-10 geni eksik olan farelerde *P. gingivalis* ile deneysel periodontitis oluşturulan bir çalışmada bu hayvanların alveolar kemik kaybına daha duyarlı oldukları gözlenmiştir (260). Al-Rasheed ve ark. IL-10 eksikliği bulunan farelerdeki kemik kaybının IL-10 eksikliği bulunmayan farelere göre yaş ile birlikte anlamlı derecede artış gösterdiğini rapor etmiştir (261). Fakat IL-10 seviyelerinin periodontal hastalık ile ilişkisi konusunda çelişkili sonuçlar vardır. Lappin ve ark. IL-10'un enflame periodontal dokulardan salgılandığını ve bu durumun hastalığın daha hafif olması ile ilişkili olduğunu belirtmiştir (262). Hirose ve ark. hem sağlıklı hem de periodontitis hastalarında IL-10 görüldüğünü, fakat yaptıkları çalışmada A.a ile enfekte olan hastalarda IL-10 seviyelerinin anlamlı derecede azaldığını belirtmiştir (263). Gamonal ve ark. periodontitisli hastaların dişeti oluğu sıvısında % 47 oranında IL-10 olduğunu ve sağlıklı katılımcılarda ise IL-10 tespit edilemediğini belirtmiştir (264). Buna karşın Goutoudi ve ark. periodontitis hastalarında sağlıklı ve hastalıklı bölgelerden faz I periodontal tedavi öncesi alınan DOS örneklerindeki IL-10 seviyeleri arasında farklılık bulunmadığını ve faz I periodontal tedavi sonrasında da IL-10 seviyelerinde anlamlı bir değişiklik olmadığını belirtmiştir (5). Toker ve ark. yaptığı çalışmada ise sığ, orta

derinlikte ve derin periodontal ceplerden alınan DOS örneklerindeki IL-10 seviyelerini sağlıklı kişilerden alınan DOS örneklerindeki IL-10 seviyeleri ile karşılaştırdığında, başlangıçta orta derinlikte ve derin ceplerde IL-10 seviyelerinin sağlıklı gruptan daha fazla olduğu rapor edilmiştir. Faz I tedavi sonrasında ise IL-10 seviyeleri arasında anlamlı bir farklılık bulunamadığı belirtilmiştir (258). Fu ve ark. da DOS içeriğinde IL-10 seviyelerini incelediklerinde periodontitis hastalarında, başlangıç ve detertraj sonrası IL-10 seviyelerinde anlamlı bir değişiklik olmadığını belirtmiştir (259). Bizim çalışmamızda ise DPK grubundaki IL-10 seviyesi SK grubuna göre yüksek olsa da gruplar arasında anlamlı fark bulunamamıştır.

Glutasyon peroksidaz, aktif bölgelerinde selenosistein bulunduran memelilerdeki 3 majör selenoenzimden birisidir (265). GSH-Px, GSH'yi indirgeyici ajan olarak kullanarak hidrojen peroksit ve çeşitli hidroksiperoksitleri zararsız hale getirir (266). Renard ve ark. yaptıkları çalışmada GSH-Px inhibisyonunun IL-1 $\beta$  uyarılmasına bağlı NF- $\kappa$ B aktivasyonunda artışa sebep olduğunu belirtmiştir. Fakat bazı periodontal patojenlerin de GSH veya sisteini kullanarak hidrojen sülfid oluşumuna neden olabildikleri rapor edilmektedir (267). Bunun sonucunda gerçekleşecek NF- $\kappa$ B aktivasyonu pro-enflamatuvar sitokin üretimini uyarılabilmektedir (268).

GSH-Px ile periodontitis ilişkisini inceleyen çalışmalar ele alındığında, Patel ve ark. periodontitis grubundaki serum ve dişeti oluğu sıvısında GSH-Px seviyelerinin sağlıklı gruba göre daha fazla olduğunu ve cerrahi olmayan periodontal tedavi sonrası GSH-Px seviyelerinin anlamlı seviyede azalma gösterdiğini rapor etmiştir (266). Aynı çalışmada araştırmacılar serum ve DOS içeriğindeki GSH-Px seviyelerini karşılaştırdığında ise dişeti oluğu sıvısındaki GSH-Px seviyesinin daha fazla olduğunu ve buna açıklama olarak lokal olarak üretilen glutasyon peroksidazın bu farkta rolü olabileceğini belirtmişlerdir (266). Wei ve ark. da yaptıkları çalışmada periodontitis hastalarında DOS içeriğindeki GSH-Px seviyesinin sağlıklı gruba göre yüksek olduğunu fakat GSH-Px aktivitesinde azalma olduğunu belirtmiştir (268). Bu çalışmalardan farklı olarak Pradnya ve ark. serum örneklerinde ve Hemashree ve ark. ise tükürük örneklerinde yaptıkları çalışmalarda periodontitis grubunun GSH-Px seviyesinin sağlıklı gruba göre daha yüksek olduğunu rapor etmiştir (269,270). Tsai ve ark. ise periodontitis hastalarında sağlıklı kontrol grubuna göre GSH miktarının daha az olduğunu fakat GSH-Px seviyelerinde anlamlı bir farklılık oluşmadığını belirtmiştir. Araştırmacılar, antioksidan mekanizmalar tarafından GSH'nin kullanıldıktan sonra geri dönüşümünün

yetersiz olmasının GSH seviyelerinin düşük olmasına açıklama olabileceğini belirtmişlerdir (135). Bizim çalışmamızda GSH-Px seviyeleri açısından gruplarda yakın değerler elde edilmiş olup bu değerler istatistiksel bir farklılık göstermemiştir.

Membran veya lipoproteinlerdeki poliansatüre yağ asitleri, ROT ile etkileşime girdiğinde LPO süreci başlamaktadır. LPO sürecinde yağ asitleri lipid peroksitlere ve sekonder metabolitlere dönüşür. Lipid peroksitlerin kontrolsüz üretiminin oksidatif strese neden olduğu ve hücre bütünlüğüne zarar verdiği gösterilmiştir (271). LPO seviyelerini ölçebilmek için çeşitli yöntemler mevcuttur. Bunun için en çok kullanılan yöntemlerden biri yağ asitlerinin lipid peroksidasyonunda son ürün olarak ortaya çıkan MDA seviyesinin ölçülmesidir (272).

Çalışmamızda dişeti dokusu MDA seviyeleri en düşük olarak sağlıklı kontrol grubunda, en yüksek olarak da DPK grubunda ortaya çıkmıştır. Fakat bu değerler istatistiksel olarak anlamlılık düzeyine ulaşmamıştır. Akalın ve ark. yaptıkları çalışmada periodontitis ve kontrol gruplarında serum, tükürük ve dişeti oluğu sıvısı MDA seviyelerini incelemiş, tükürük ve dişeti oluğu sıvısı MDA seviyelerinin periodontitis grubunda anlamlı derecede yüksek bulunduğunu rapor etmiştir. Aynı çalışmada serum MDA seviyelerinde ise anlamlı fark bulunmadığı belirtilmiştir (271). Çanakçı ve ark. yaptıkları bir çalışmada periodontitis hastaları ile kontrol gruplarının tükürük MDA seviyelerini ve klinik periodontal parametrelerini incelemiştir. Bu çalışmada periodontitis grubunun MDA seviyeleri yüksek bulunmasına rağmen, MDA seviyeleri ile klinik parametreler arasında bir bağlantı bulunamadığı rapor edilmiştir. Bu nedenle araştırmacılar MDA seviyelerinin periodontitis şiddeti ile direk ilişkide olmayabileceğini belirtmiştir (273). Tsai ve ark. ise periodontitis ve kontrol grupları arasında 4 hidroksi alkenalleri ve MDA ölçümleri ile yaptıkları lipid peroksidasyon incelemelerinde hem tükürük hem de DOS lipid peroksidasyon seviyelerinin periodontitis grubunda daha yüksek çıktığını rapor etmiştir. Buna ek olarak klinik parametreler ile lipid peroksidasyon seviyelerinin istatistiksel anlamlılık düzeyinde ilişkili olduğu ve bu nedenle periodontal enflamasyon miktarı ile lipid peroksidasyon arasında direk bir ilişki kurulabileceği belirtilmiştir (135).

SOD süperoksit radikallerini ve hidrojen peroksiti süpürücü etkiye sahiptir (274). SOD insanlarda periodontal ligamentte tespit edilmiştir ve dişeti fibroblastlarından salgılanan süperoksite karşı savunmada önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Fakat SOD aktivitesinin serum ve ekstraselüler sıvılarda düşüktür ve baskın olarak dokularda

bulunmaktadır (275). Ghallab ve ark. insan dişeti oluğu sıvısında yaptıkları çalışmada sağlıklı gruptaki SOD miktarının kronik periodontitis ve agresif periodontitis gruplarından istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla olduğunu belirtmiştir (275). Periodontitis hastalarında total antioksidan kapasitenin azaldığını belirten çalışmalar mevcuttur (9,10,276). Bu nedenle antioksidan bir enzim olan SOD miktarının hastalıklı gruplarda daha az olması bu veriler ile uyumludur. Buna karşın Akalın ve ark. yaptıkları çalışmada dişeti oluğu sıvısındaki SOD aktivitesini incelemiş ve kronik periodontitis grubundaki SOD aktivitesinin sağlıklı gruba göre daha fazla olduğunu belirtmiştir. Lokal bir üretim olsa bile hastalıkta artan DOS miktarının incelenecek bileşenin konsantrasyonunun azalmasına neden olabileceği için, Akalın ve ark. Çalışmalarda SOD aktivitesinin lmünün SOD miktarının ölümüne göre daha güvenilir bir veri sağlayacağını belirtmektedir (277). Çalışmamızdaki SOD seviyeleri incelendiğinde en düşük değerler Ghallab ve ark. alışmasına benzer olarak DPK grubunda bulunmuştur (57.43 ng/ml). SK, DP400 ve DP800 grupları ise yakın sonuçlar vermiştir (63.83, 62.74, 67.96). Fakat DPK grubu ile diğer gruplar arasında bu fark istatistiksel anlamlılık seviyesine ulaşmamıştır ( $p= 0.065$ ). Bu sonuçlar doğrultusunda SOD aktivitesi ile miktarının birlikte değerlendirildiği daha geniş çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Rao ve ark. insanlarda serum örnekleri üzerinde yaptıkları çalışmada periodontitis hastalarının TAS değerlerinin sağlıklı kontrol grubuna göre daha az olduğunu rapor etmiştir (278). Konopka ve ark. katılımcıları sağlıklı kontrol, kronik periodontitis ve agresif periodontitis olarak gruplandırığı çalışmada hem venöz kan hem de dişeti dokusundan alınan kan örneklerinde TAS değerini incelemiştir. Çalışmacılar dişeti dokusundan alınan örneklerin enflamasyonun seviyesi ile korelasyonda olacağını düşündüklerini belirtmiştir. Fakat alışma sonuçları incelendiğinde, periferik kan örneklerinin tümünde hastalıklı grupların TAS değerleri sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük çıkmıştır. Dişetinden alınan kan örneklerinde ise sadece kronik periodontitis grubunun TAS değerlerinin sağlıklı gruba göre anlamlı derecede düşük olduğu belirtilmiştir (279). Verma ve ark. insan serum ve tükürük örneklerinde TAS değerlerini periodontitis hastaları ve sağlıklı kontrol grupları arasında karşılaştırmıştır. Bu çalışmada serum ve tükürük TAS değerlerinin sağlıklı kontrol grubunda diğer gruplara göre anlamlı derece fazla olduğu ve TOS değerlerinin ise yine sağlıklı kontrol grubunda diğer gruplara göre anlamlı derecede az olduğu sonucuna ulaşılmıştır. TOS değerinin TAS değerine oranlanması ile elde edilen OSI

değerleri incelendiğinde ise serum ve tükürük OSI değerlerinin sağlıklı kontrol grubunda periodontitis hastalarına göre anlamlı derecede düşük çıktığı gözlemlenmiştir (280). Mashayaki ve ark. yaptıkları çalışmada tükürük TAS değerlerinin periodontitis şiddeti ile korelasyon içinde olduğunu rapor etmiştir (281). Brock ve ark. serum, plazma, DOS ve tükürük içeriğinde TAS değerlerini araştırmıştır. Plazma ve DOS örneklerinde periodontitis grubunda TAS değerlerinin anlamlı derecede düşük olduğu tespit edilmiş fakat, serum ve tükürük ölçümlerinde periodontitis grubunda daha düşük değerler elde edilmesine rağmen anlamlı fark bulunamamıştır (9). Bu verilere ek olarak Brock ve ark. sağlıklı kişilerin dişeti oluğu sıvısındaki TAS değerinin diğer örneklerden daha fazla olduğunu belirtmiştir. Bu nedenle dişeti oluğu sıvısında lokal bir üretim veya depolama olduğu araştırmacılar tarafından düşünülmektedir. Narendra ve ark. ise serum ve dişeti oluğu sıvısında TOS değerlerini incelemiş ve sağlıklı grupta TOS değerlerinin periodontitis grubuna göre daha düşük olduğunu rapor etmiştir (282). Bizim çalışmamızda ise sağlıklı grup TOS ve OSI değerleri DPK grubuna göre düşük olarak, TAS değerleri ise daha yüksek olarak gözlenmiştir. İstatiksel olarak TOS ve OSI değerlerinde SK grubu, DPK ve DP800 gruplarına göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur. SK grubu TAS değerlerinin ise DPK grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu gözlenmiştir. Çalışmamızdaki veriler değerlendirildiğinde en iyi değerlerin SK grubunda izlenmesi yukarıdaki çalışmaların verileri ile paralellik göstermektedir.

Alveolar kemik kaybının incelenmesinde morfometri, 2 boyutlu radyografi ve 3 boyutlu mikro-BT yöntemleri kullanılmaktadır (283–287). Chung ve ark. yaptıkları bir çalışmada periodontal lezyonları hem morfometri yöntemi hem de mikro-BT yöntemi kullanarak ölçmüş, yapılan değerlendirmede iki yöntem arasında anlamlı bir fark bulunmadığını rapor etmiştir (208). Mikro-BT ile yapılan ölçümler ise 2 boyutlu (lineer) veya 3 boyutlu (hacimsel) olarak yapılabilmektedir (288–294). Çalışmamızda ise lineer ölçüm Aral ve ark. ve Chen ve ark. yaptıkları çalışmalarda açıklandığı şekilde yapılmıştır (292,293). Kemik kaybı ölçümlerinde tüm değerlerin ortalamalarının alındığı çalışmalar bulunmakla birlikte mezial ve distal ölçümlerin ayrı olarak değerlendirildiği çalışmalar da mevcuttur (293,295,296). Bizim çalışmamızda da değerler mezial ve distal bölgelerde ayrı olarak değerlendirilmiştir. Yapılan değerlendirmelerde *P. eurycarpa* ekstresi uygulanan gruplarda alveolar kemik kaybında azalma gözlenmiştir. Deneysel periodontitis gruplarındaki kemik kaybı seviyesinin SK



grubuna göre daha fazla olması ligatür ile deneysel periodontitis oluşturulması yöntemi yardımıyla hedeflenen kemik kaybının elde edildiğini göstermektedir. Bitki ekstresi kullanılan gruplarda kemik kaybının daha az olması ile bitki ekstratlarının alveolar kemik kaybını azaltmada başarılı olduğunu göstermektedir.

Antioksidan etkisinin incelenmesi amacıyla *P. eurycarpa* bitkisi esansiyel yağı kullanılan bir çalışmada; bitki esansiyel yağı, demir iyonu indirgeyici antioksidan güç (FRAP) yöntemiyle yapılan etkinlik karşılaştırmasında referans antioksidan olarak kullanılan bütillenmiş hidroksi toluen (BHT) bileşiğinden daha iyi sonuçlar vermiştir (297). Gourine ve ark. yaptıkları çalışmada *P. atlantica Desf.* bitkisinin BHT ve bütillenmiş hidroksi anisol bileşenlerinden daha iyi antioksidan etki gösterdiğini rapor etmiştir (298). Rezaie ve ark. FRAP analizi kullanılarak yaptıkları çalışmada *P. atlantica subsp. mutica (P. atlantica Desf.)* bitkisinin BHT bileşeninden daha iyi antioksidan etkiye sahip olduğunu gözlemlemiştir (299).

Fenol bileşenlerinin yüksek antioksidan kapasiteleri olduğu ve serbest radikallerin elimine edilmesinde ve oluşumlarının önlenmesinde etkili oldukları bilinmektedir (297). Rezaie ve ark. *P. atlantica subsp. mutica* esansiyel yağının antioksidan etkisinin içeriğindeki monotерpenler ve seskiterpenlerden kaynaklandığını düşündüklerini belirtmiştir (299). 2,2 difenil 1-pikrilhidrazil serbest radikalini süpürücü etkileri incelenmek üzere terpenoidler grubundan  $\alpha$ -pinen, limonen, myrecene, geraniol, linalool, nerol ve terpineol bileşenlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada  $\alpha$ -pinen en yüksek etkili bulunmuştur. Fakat bu çalışmada  $\alpha$ -pinen ve ele alınan diğer bileşenlerin indirgeyici güçlerinin BHT bileşeninden daha az olduğu belirtilmiştir (300). Antioksidan özelliklerinin yanında  $\alpha$ -pinen aynı zamanda bakterisit özelliğe de sahiptir.  $\alpha$ -pinen bileşeninin yüksek konsantrasyonlarda bakteri hücre membranında bozulmaya neden olduğu tespit edilmiştir (301).

*P. atlantica* bitki ekstratının *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis* ve *Streptococcus salivarius* üzerine etkileri incelendiğinde, *S. mutans* ve *S. mitis* üzerine etkili olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada *P. atlantica* bitki ekstresinin *S. salivarius* üzerine anlamlı bir etkisi olmadığı bulunmuştur (302). Bir başka çalışmada *P. eurycarpa* bitki ekstresinin *P. gingivalis* üzerine etkisi incelendiğinde MIC değeri 12  $\mu$ L/ml olarak bulunmuştur (19).

Azeez ve ark. ratlar üzerine yaptığı deneysel periodontitis çalışmasında *P. eurycarpa* esansiyel yağından elde edilen jel ile kolerheksidin jelini karşılaştırmıştır. Bu

çalışmada histolojik incelemede *P. eurycarpa* bitkisinden elde edilen jelin periodontal hasarı ve alveolar kemik kaybını azalttığı gözlenmiştir (212). Klorheksidin jelin etkisi ile bitki esansiyel yağından elde edilen jelin etkisi karşılaştırıldığında bitki grubunun klorheksidin grubuna benzer ya da daha iyi sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir (212). Çalışmamızda alveolar kemik kaybı bitki ekstresi verilen gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmakla birlikte DP400 ve DP800 grupları arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Bu sonuçlar Azeez ve ark. yaptıkları çalışmanın sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Fakat biyokimyasal parametreler açısından çalışmamızda DP400 ve DP800 gruplarında DPK grubuna göre anlamlı farklılık içeren sonuçlar gözlenmemiştir. Azeez ve ark. çalışması ile çalışmamız arasındaki bu farklılık, ekstrenin uygulanma yolu nedeniyle dişetindeki bitki ekstresi konsantrasyonlarının değişkenlik göstermesi ve buna bağlı olarak dokudaki biyokimyasal değişikliklerin farklılık göstermesinden kaynaklanmış olabilir.

Arami ve ark. yaptıkları bir çalışmada *P. eurycarpa* bitkisinden elde ettikleri ağız bakım suyunu klorheksidin gargara ile karşılaştırmış ve *P. eurycarpa* ağız bakım suyunun plak oluşumunu ve subgingival mikroorganizma miktarını azalttığını gözlemlemiştir (15). Benhamnou ve ark. *P. lentiscus* ve *P. atlantica* bitki ekstrelerinin antimikrobiyal ve süperoksit anyonu süpürücü etkilerinin olduğunu rapor etmiştir (303). Bir başka çalışmada *P. vera* bitkisinin, lenfosit hücre kültürü ortamına tert butil hidroksiperoksit ilave edildiğinde artan hücre mortalitesini doz bağımlı olarak azalttığını göstererek bu bitki ekstresinin sitoprotektif etkiye de sahip olduğunu rapor etmiştir (304).

Deneysel periodontitis üzerine yapılan çalışmalarda kemik kaybının azaldığı fakat biyokimyasal parametrelerin aynı oranda değişmediği çalışmalar da mevcuttur (305–308). Kırzioğlu ve ark. rosuvastatinin deneysel periodontitis üzerine etkilerini inceledikleri çalışmalarında rosuvastatin uygulanan deneysel periodontitis grubundaki kemik kaybının sadece deneysel periodontitis oluşturulan gruba göre anlamlı derecede azaldığını fakat, serum IL1- $\beta$ , MDA, GSH-Px, SOD, GSH seviyelerinde anlamlı bir fark bulunmadığını rapor etmiştir (307). Başka bir çalışmada *boswellic asit* ve *chebulagic asit*'in deneysel periodontitis üzerine etkileri incelenmiş, alveolar kemik seviyesi açısından araştırılan ajanlar lehine anlamlı sonuçlar elde edilse de serum örnekleri üzerinde incelenen TAS ve OSI değerlerinde anlamlı bir sonuç çıkmadığı belirtilmiştir (309). Aral ve ark. propolisin deneysel periodontitis üzerine etkisini

incelemek için yaptıkları çalışmada aynı şekilde alveolar kemik kaybında azalma gözlemlenmiş fakat IL1- $\beta$  değerlerinde anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir (308). Ayrıca dişeti dokusu, dişeti oluğu sıvısı, serum, tükürük gibi yapılarda yapılan ve bu yapılar arasında periodontitis için incelenen parametrelerin farklı yapılarda farklı sonuçlar verdiği çalışmalar da mevcuttur (9,271,279). Çalışmamızda uygulanan bitki ekstratının deneysel periodontitis grubuna göre kemik kaybını anlamlı derecede azalttığı, fakat biyokimyasal parametreler üzerinde anlamlı bir fark oluşturmadığı gözlemlenmiştir. Çalışmamızın kısıtlamaları değerlendirildiğinde biyokimyasal parametreler sadece dişeti dokusunda incelendiği için serum gibi diğer yapılardaki değişiklikler üzerine bir bilgi sahibi olunamamıştır. Ayrıca çalışmamızda uygulanan dozlara daha önceki *Pistacia* çalışmalarına göre karar verilmiştir. Bu nedenlerle etkin *P. eurycarpa* bitki ekstresi dozunun tespiti için daha geniş doz rejimlerini içeren çalışmalar yapılmalıdır. Buna ek olarak *P. eurycarpa* bitki ekstresinin deneysel periodontitis modeli üzerindeki etki mekanizmasını keşfetmek için incelemelerin dişeti dokusu dışında diğer yapılarda da yapıldığı daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Deneysel periodontitis oluşturulan ratlarda *P. eurycarpa* bitki ekstresinin alveolar kemik kaybı ve dişeti dokusu biyokimyasal parametreleri üzerine etkilerinin incelendiği bu çalışmada;

1. 2. molar dişin servikal bölgesine 4-0 ligatür bağlanarak deneysel periodontitis oluşturulan gruplarda kemik kaybının sağlıklı gruba göre artmış olduğu gözlemlendi.

2. Sağlıklı grubun IL-1 $\beta$ , TOS ve OSI değerlerinin deneysel periodontitis oluşturulan gruplardan yüksek olduğu, TAS değerlerinin ise deneysel periodontitis oluşturulan gruplardan düşük olduğu gözlemlendi.

3. GSH-Px değerlerinin gruplar arasında değişiklik göstermediği gözlemlendi.

4. Gavaj yolu ile bitki ekstresi uygulanan gruplar ile deneysel periodontitis kontrol grubu arasında IL-1 $\beta$ , IL-10, GSH-Px, MDA, SOD, TAS, TOS ve OSI biyokimyasal parametreleri açısından anlamlı bir farklılık bulunamamıştır.

5. Deneysel periodontitis oluşturulan gruplarda yapılan mikro bilgisayarlı tomografi ölçümleri sonucunda, ekstre uygulanan gruplardaki kemik kaybının deneysel periodontitis kontrol grubuna göre daha az olduğu gözlemlendi.

6. Bildiğimiz kadarıyla çalışmamız rat deneysel periodontitis modelinde *P. eurycarpa* bitki ekstresinin sistemik uygulandığı ilk çalışma olduğundan dolayı; tüm periodontal dokuları ve serum örneklerini içeren, daha geniş parametrelerin ve daha geniş doz rejimlerinin incelendiği ek çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

## KAYNAKLAR

1. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, Flemmig TF, Garcia R, Giannobile W V., Graziani F, Greenwell H, Herrera D, Kao RT, Kebschull M, Kinane DF, Kirkwood KL, Kocher T, Kornman KS, Kumar PS, Loos BG, Machtei E, Huanxin M, Mombelli A, Needleman I, Offenbacher S, Seymour GJ, Teles R, Tonetti MS. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol.* 89(December 2017):S173–82.
2. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol.* 89(January):S159–72.
3. Chapple ILC. Time to take periodontitis seriously. *BMJ.* 348(April):1–2.
4. Yücel ÖÖ, Berker E, Gariboğlu S, Oflu H. Interleukin-11, interleukin-1 $\beta$ , interleukin-12 and the pathogenesis of inflammatory periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 35(5):365–70.
5. Goutoudi P, Diza E, Arvanitidou M. Effect of periodontal therapy on crevicular fluid interleukin-1 $\beta$  and interleukin-10 levels in chronic periodontitis. *J Dent.* 32(7):511–20.
6. Reis C, Da Costa AV, Guimarães JT, Tuna D, Braga AC, Pacheco JJ, Arosa FA, Salazar F, Cardoso EM. Clinical improvement following therapy for periodontitis: Association with a decrease in IL-1 and IL-6. Vol. 8, *Experimental and Therapeutic Medicine.* 2014. p. 323–7.
7. D’Aiuto F, Nibali L, Parkar M, Patel K, Suvan J, Donos N. Oxidative stress, systemic inflammation, and severe periodontitis. *J Dent Res.* 89(11):1241–6.
8. Akpınar A, Toker H, Özdemir H, Bostancı V, Aydın H. The effects of non-surgical periodontal therapy on oxidant and anti-oxidant status in smokers with chronic periodontitis. *Arch Oral Biol.* 58(6):717–23.
9. Brock GR, Butterworth CJ, Matthews JB, Chapple ILC. Local and systemic total antioxidant capacity in periodontitis and health. *J Clin Periodontol.* 31(7):515–21.
10. Chapple ILC, Matthews JB. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontol 2000.* 43(1):160–232.

11. Romero FJ, Bosch-Morell F, Romero MJ, Jareño EJ, Romero B, Marín N, Romá J. Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. *Environ Health Perspect.* 106(SUPPL. 5):1229–34.
12. Tanideh N, Tanideh N, Ghafari V, Ebrahimi R, Habibagahi R, Koohi- O. Effects of *Calendula Officinalis* and *Hypericum Perforatum* on Antioxidant , Anti-Inflammatory and Histopathology Indices of Induced Periodontitis in Male Rats. *J Dent Shiraz Univ Med Sci.* Online Pub:1–8.
13. Choi GE, Hyun KY. Inhibitory effect of *Acer tegmentosum maxim* extracts on *P. gingivalis* LPS-induced periodontitis. *Arch Oral Biol.* 109:104529.
14. Hadjimbei E, Botsaris G, Goulas V, Gekas V. Health-Promoting Effects of *Pistacia* Resins: Recent Advances, Challenges, and Potential Applications in the Food Industry. *Food Rev Int.* 31(1):1–12.
15. Arami S, Mojaddadi MA, Pourabbas R, Chitsaz MT, Delazar A, Mobayen H. The Effect of *Pistacia atlantica Varmutica* Mouthwash on Dental Plaque Bacteria and Subgingival Microorganisms: A Randomized and Controlled Triple-blind Study. *Drug Res (Stuttg).* 65(9):463–7.
16. Milia E, Usai M, Szotáková B, Elstnerová M, Králová V, D'hallewin G, Spissu Y, Barberis A, Marchetti M, Bortone A, Campanella V, Mastandrea G, Langhansová L, Eick S. The pharmaceutical ability of *Pistacia lentiscus L.* Leaves essential oil against periodontal bacteria and *Candida sp.* and its anti-inflammatory potential. *Antibiotics.* 9(6):1–16.
17. Hosseinzadeh H, Tabassi SAS, Moghadam NM, Rashedinia M, Mehri S. Antioxidant activity of *Pistacia vera* fruits, leaves and gum extracts. *Iran J Pharm Res.* 11(3):879–87.
18. Azeez SH, Gaphor SM, Sha AM, Garib BT. Effect of *Pistacia atlantica* subsp. *kurdica* Gum in Experimental Periodontitis Induced in Wistar Rats by Utilization of Osteoclastogenic Bone Markers. *Molecules.* 25(24).
19. Azeez SH, Gaphor SM. Evaluation of antibacterial effect against *porphyromonas gingivalis* and biocompatibility of essential oil extracted from the gum of *pistacia atlantica* *Kurdica*. *Biomed Res Int.* 2019.
20. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet.* 366(9499):1809–20.
21. Michael G. N, Takei H, R. Klokkevold P, Carranza F. Newman and Carranza's

- Clinical Periodontology 13th ed. 13th ed. Elsevier Health Sciences. Philadelphia; 2018.
22. Wolff L, Dahlén G, Aeppli D. Bacteria as Risk Markers for Periodontitis. *J Periodontol.* 65(5s):498–510.
  23. Kinane DF, Demuth DR, Gorr SU, Hajishengallis GN, Martin MH. Human variability in innate immunity. *Periodontol 2000.* 45(1):14–34.
  24. Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease: a summary of current work. *Lab Investig.* 34(3):235–49.
  25. Lindhe J, Rylander H. Experimental gingivitis in young dogs. *Eur J Oral Sci.* 83(6):314–26.
  26. Schroeder HE. Quantitative parameters of early human gingival inflammation. *Arch Oral Biol.* 15(5).
  27. Dentino A, Lee S, Mailhot J, Hefti AF. Principles of periodontology. *Periodontol 2000.* 61(1):16–53.
  28. Brewer JH, Allgeier DL. Safe Self-contained Carbon Dioxide-Hydrogen Anaerobic System. *Appl Microbiol.* 14(6):985–8.
  29. Aranki A, Syed SA, Kenney EB, Freter R. Isolation of Anaerobic Bacteria from Human Gingiva ... simplified glove box procedure 1969.pdf. 17(4):568–76.
  30. Moore WEC, Moore LVH. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 5(1):66–77.
  31. Kolenbrander PE, Andersen RN, Kazmerzak K, Wu R, Palmer RJ. Spatial organization of oral bacteria in biofilms. *Methods Enzymol.* 310:322–32.
  32. Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. “Checkerboard” DNA-DNA hybridization. *Biotechniques.* 17(4):788–92.
  33. Choi BK, Paster BJ, Dewhirst FE, Gobel UB. Diversity of cultivable and uncultivable oral spirochetes from a patient with severe destructive periodontitis. *Infect Immun.* 62(5):1889–95.
  34. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol.* 183(12):3770–83.
  35. Donnell MTC, Griffen ANNL, Moeschberger ML, Dalton RE, Fuerst PA, Leys EJ. Concordance of *Porphyromonas gingivalis* Colonization in Families. *J Clin Microbiol.* 35(2):455–61.

36. Palmer RJ, Gordon SM, Cisar JO, Kolenbrander PE. Coaggregation-mediated interactions of streptococci and actinomyces detected in initial human dental plaque. *J Bacteriol.* 185(11):3400–9.
37. Cvitkovitch DG, Li Y-H, Ellen RP. Quorum sensing and biofilm formation in Streptococcal infections. *J Clin Invest.* 112(11):1626–32.
38. Listgarten MA. Structure of the Microbial Flora Associated with Periodontal Health and Disease in Man: A Light and Electron Microscopic Study. *J Periodontol.* 47(1):1–18.
39. Mah TFC, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 9(1):34–9.
40. Roberts AP, Mullany P. Genetic basis of horizontal gene transfer among oral bacteria. Vol. 42, *Periodontology 2000.* 2006. p. 36–46.
41. Kolenbrander PE, Palmer RJ, Rickard AH, Jakubovics NS, Chalmers NI, Diaz PI. Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontol 2000.* 42(1):47–79.
42. Socransky, Sigmund S., Haffajee A. Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000.* 38:135–87.
43. Tanner A, Maiden MFJ, Macuch PJ, Murray LL, Kent RL. Microbiota of health, gingivitis, and initial periodontitis. *J Clin Periodontol.* 25(2):85–98.
44. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 25(2):134–44.
45. Lamell CW, Griffen AL, McClellan DL, Leys EJ. Acquisition and colonization stability of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in children. *J Clin Microbiol.* 38(3):1196–9.
46. Marsh PD, Percival RS. The oral microflora - Friend or foe? Can we decide? *Int Dent J.* 56(4 SUPPL. 1):233–9.
47. Hornef MW, Wick MJ, Rhen M, Normark S. Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 3(11):1033–40.
48. Schroeder HE, Listgarten MA. The gingival tissues: the architecture of periodontal protection. *Periodontol 2000.* 13(1):91–120.
49. Dale BA, Fredericks LP. Antimicrobial peptides in the oral environment: Expression and function in health and disease. Vol. 7, *Current Issues in Molecular Biology.* 2005. p. 119–34.



50. Chung W, Dommisch H, Yin L, Dale B. Expression of Defensins in Gingiva and Their Role in Periodontal Health and Disease. *Curr Pharm Des.* 13(30):3073–83.
51. Tonetti MS, Imboden MA, Lang NP. Neutrophil Migration Into the Gingival Sulcus Is Associated With Transepithelial Gradients of Interleukin-8 and ICAM-1. *J Periodontol.* 69(10):1139–47.
52. Krisanaprakornkit S, Weinberg A, Perez CN, Dale BA. Expression of the peptide antibiotic human  $\beta$ -defensin 1 in cultured gingival epithelial cells and gingival tissue. *Infect Immun.* 66(9):4222–8.
53. Marshall RI. Gingival defensins: Linking the innate and adaptive immune responses to dental plaque. *Periodontol 2000.* 35(19):14–20.
54. Kanzler H, Barrat FJ, Hessel EM, Coffman RL. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nat Med.* 13(5):552–9.
55. Mahanonda R, Pichyangkul S. Toll-like receptors and their role in periodontal health and disease. Vol. 43, *Periodontology 2000.* *Periodontol 2000;* 2007. p. 41–55.
56. Agrawal S, Agrawal A, Doughty B, Gerwitz A, Blenis J, Van Dyke T, Pulendran B. Cutting Edge: Different Toll-Like Receptor Agonists Instruct Dendritic Cells to Induce Distinct Th Responses via Differential Modulation of Extracellular Signal-Regulated Kinase-Mitogen-Activated Protein Kinase and c-Fos. *J Immunol.* 171(10):4984–9.
57. Egelberg J. Permeability of the dento-gingival blood vessels: I. Application of the vascular labelling method and gingival fluid measurements. *J Periodontal Res.* 1(3):180–91.
58. Seymour GJ, Taylor JJ. Shouts and whispers: An introduction to immunoregulation in periodontal disease. Vol. 35, *Periodontology 2000.* *Periodontol 2000;* 2004. p. 9–13.
59. Seymour GJ, Gemmell E. Cytokines in periodontal disease: Where to from here? *Acta Odontol Scand.* 59(3):167–73.
60. Kawai T, Matsuyama T, Hosokawa Y, Makihira S, Seki M, Karimbux NY, Goncalves RB, Valverde P, Dibart S, Li YP, Miranda LA, Ernst CWO, Izumi Y, Taubman MA. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *Am J Pathol.* 169(3):987–98.

61. 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. *Int J Mol Med.* 11(1):17–21.
62. Bostanci N, Ilgenli T, Emingil G, Afacan B, Han B, Töz H, Atilla G, Hughes FJ, Belibasakis GN. Gingival crevicular fluid levels of RANKL and OPG in periodontal diseases: Implications of their relative ratio. *J Clin Periodontol.* 34(5):370–6.
63. Pérez-Chaparro PJ, Gonçalves C, Figueiredo LC, Faveri M, Lobão E, Tamashiro N, Duarte P, Feres M. Newly identified pathogens associated with periodontitis: A systematic review. *J Dent Res.* 93(9):846–58.
64. Feres M, Teles F, Teles R, Figueiredo LC, Faveri M. The subgingival periodontal microbiota of the aging mouth. *Periodontol 2000.* 72(1):30–53.
65. Benakanakere M, Kinane DF. Innate cellular responses to the periodontal biofilm. In: *Periodontal Disease.* S. Karger AG; 2011. p. 41–55.
66. Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontol 2000.* 14(1):112–43.
67. Sorsa T, Gursoy UK, Nwhator S, Hernandez M, Tervahartiala T, Leppilahti J, Gursoy M, Könönen E, Emingil G, Pussinen PJ, Mäntylä P. Analysis of matrix metalloproteinases, especially MMP-8, in gingival crevicular fluid, mouthrinse and saliva for monitoring periodontal diseases. Vol. 70, *Periodontology 2000.* Blackwell Munksgaard; 2016. p. 142–63.
68. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS, Mealey BL, Papapanou PN, Sanz M, Tonetti MS. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Periodontol.* 89(S1):S1–8.
69. Tawfig N. Proinflammatory Cytokines and Periodontal Disease. *J Dent Probl Solut.* 3:012–7.
70. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today.* 17(3):138–46.
71. Balkwill FR, Burke F. The cytokine network. *Immunol Today.* 10(9):299–304.
72. Hamblin A. *Cytokines and cytokine receptors.* Oxford: IRL Pr; 1993. 90 p.
73. Mosmann TR. Cytokines: is there biological meaning? *Curr Opin Immunol.*

- 3(3):311–4.
74. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest*. 118(2):503–8.
  75. Graves DT, Cochran D. The Contribution of Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor to Periodontal Tissue Destruction. *J Periodontol*. 74(3):391–401.
  76. Pan W, Wang Q, Chen Q. The cytokine network involved in the host immune response to periodontitis. *Int J Oral Sci* (July).
  77. Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev*. 281(1):8–27.
  78. Lavu V, Venkatesan V, Lakkakula BVKS, Venugopal P, Paul SFD, Rao SR. Polymorphic regions in the interleukin-1 gene and susceptibility to chronic periodontitis: A genetic association study. *Genet Test Mol Biomarkers*. 19(4):175–81.
  79. Ben-Sasson SZ, Hu-Li J, Quiel J, Cauchetaux S, Ratner M, Shapira I, Dinarello CA, Paul WE. IL-1 acts directly on CD4 T cells to enhance their antigen-driven expansion and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106(17):7119–24.
  80. Mills KHG, Dungan LS, Jones SA, Harris J. The role of inflammasome-derived IL-1 in driving IL-17 responses. *J Leukoc Biol*. 93(4):489–97.
  81. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med*. 201(2):233–40.
  82. Gilowski Ł, Wiench R, Płocica I, Krzemiński TF. Amount of interleukin-1 $\beta$  and interleukin-1 receptor antagonist in periodontitis and healthy patients. *Arch Oral Biol*. 59(7):729–34.
  83. García-Hernández AL, Muñoz-Saavedra ÁE, González-Alva P, Moreno-Fierros L, Llamosas-Hernández FE, Cifuentes-Mendiola SE, Rubio-Infante N. Upregulation of proteins of the NLRP3 inflammasome in patients with periodontitis and uncontrolled type 2 diabetes. *Oral Dis*. 25(2):596–608.
  84. Mantovani A, Dinarello CA, Molgora M, Garlanda C. Interleukin-1 and Related Cytokines in the Regulation of Inflammation and Immunity. Vol. 50, *Immunity*. Immunity; 2019. p. 778–95.
  85. Lapérine O, Cloitre A, Caillon J, Huck O, Bugueno IM, Pilet P, Sourice S, Le Tilly E, Palmer G, Davideau JL, Geoffroy V, Guicheux J, Beck-Cormier S, Lesclous P. Interleukin-33 and RANK-L interplay in the alveolar bone loss

- associated to periodontitis. *PLoS One*. 11(12).
86. Tada H, Matsuyama T, Nishioka T, Hagiwara M, Kiyoura Y, Shimauchi H, Matsushita K. *Porphyromonas gingivalis* gingipain-dependently enhances IL-33 production in human gingival epithelial cells. *PLoS One*. 11(4).
  87. Tada H, Suzuki R, Nemoto E, Shimauchi H, Matsushita K, Takada H. Increases in IL-33 production by fimbriae and lipopeptide from *Porphyromonas gingivalis* in mouse bone marrow-derived dendritic cells via toll-like receptor 2. *Biomed Res*. 38(3):189–95.
  88. Okamura H, Tsutsul H, Komatsu T, Yutsudo M, Tanimoto T, Torigoe K, Okura T, Nukada Y, Hattori K, Akita K, Namba M, Tanabe F, Konishi K, Fukuda S, Kurimoto M. Cloning of a new cytokine that induces IFN- $\gamma$  production by T cells. *Nature*. 378(6552):88–91.
  89. Li ZG, Li JJ, Sun CA, Jin Y, Wu WW. Interleukin-18 promoter polymorphisms and plasma levels are associated with increased risk of periodontitis: A meta-analysis. *Inflamm Res*. 63(1):45–52.
  90. Hamed M, Belibasakis GN, Cruchley AT, Rangarajan M, Curtis MA, Bostanci N. *Porphyromonas gingivalis* culture supernatants differentially regulate Interleukin-1 $\beta$  and Interleukin-18 in human monocytic cells. *Cytokine*. 45(2):99–104.
  91. Wang F, Guan M, Wei L, Yan H. IL-18 promotes the secretion of matrix metalloproteinases in human periodontal ligament fibroblasts by activating NF- $\kappa$ B signaling. *Mol Med Rep*. 19(1):703–10.
  92. Yoshinaka K, Shoji N, Nishioka T, Sugawara Y, Hoshino T, Sugawara S, Sasano T. Increased interleukin-18 in the gingival tissues evokes chronic periodontitis after bacterial infection. *Tohoku J Exp Med*. 232(3):215–22.
  93. Barksby HE, Lea SR, Preshaw PM, Taylor JJ. The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders. *Clin Exp Immunol*. 149(2):217.
  94. Reis C, Da Costa AV, Guimarães JT, Tuna D, Braga AC, Pacheco JJ, Arosa FA, Salazar F, Cardoso EM. Clinical improvement following therapy for periodontitis: Association with a decrease in IL-1 and IL-6. *Exp Ther Med*. 8(1):323–7.
  95. Albuquerque CM, Cortinhas AJ, Morinha FJ, Leitão JC, Viegas CA, Bastos EM.

- Association of the IL-10 polymorphisms and periodontitis: A meta-analysis. *Mol Biol Rep.* 39(10):9319–29.
96. Park-Min K-H, Ji J-D, Antoniv T, Reid AC, Silver RB, Humphrey MB, Nakamura M, Ivashkiv LB. IL-10 Suppresses Calcium-Mediated Costimulation of Receptor Activator NF- $\kappa$ B Signaling during Human Osteoclast Differentiation by Inhibiting TREM-2 Expression. *J Immunol.* 183(4):2444–55.
  97. Pendyala G, Thomas B, Kumari S. The challenge of antioxidants to free radicals in periodontitis. *J Indian Soc Periodontol.* 12(3):79.
  98. Chapple ILC. Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *J Clin Periodontol.* 24(5):287–96.
  99. Di Meo S, Reed TT, Venditti P, Victor VM. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxid Med Cell Longev.* 2016.
  100. Nibali L, Donos N. Periodontitis and Redox Status: A Review. *Curr Pharm Des.* 19(15):2687–97.
  101. McClean C, Harris RA, Brown M, Brown JC, Davison GW. Effects of Exercise Intensity on Postexercise Endothelial Function and Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev.* 2015.
  102. Roos D, Van Bruggen R, Meischl C. Oxidative killing of microbes by neutrophils. *Microbes Infect.* 5(14):1307–15.
  103. Tamaki N, Hayashida H, Fukui M, Kitamura M, Kawasaki K, Nakazato M, Maeda T, Saito T, Ito HO. Oxidative stress and antibody levels to periodontal bacteria in adults: The Nagasaki Islands study. *Oral Dis.* 20(3).
  104. Baltacıoğlu E, Yuva P, Aydın G, Alver A, Kahraman C, Karabulut E, Akalın FA. Lipid Peroxidation Levels and Total Oxidant/Antioxidant Status in Serum and Saliva From Patients With Chronic and Aggressive Periodontitis. Oxidative Stress Index: A New Biomarker for Periodontal Disease? *J Periodontol.* 85(10):1432–41.
  105. Kanzaki H, Shinohara F, Kajiya M, Kodama T. The Keap1/Nrf2 protein axis plays a role in osteoclast differentiation by regulating intracellular reactive oxygen species signaling. *J Biol Chem.* 288(32):23009–20.
  106. Gan P, Gao Z, Zhao X, Qi G. Surfactin inducing mitochondria-dependent ROS to activate MAPKs, NF- $\kappa$  B and inflammasomes in macrophages for adjuvant activity. *Sci Rep.* 6.

107. Liu W, Gu J, Qi J, Zeng XN, Ji J, Chen ZZ, Sun XL. Lentinan exerts synergistic apoptotic effects with paclitaxel in A549 cells via activating ROS-TXNIP-NLRP3 inflammasome. *J Cell Mol Med.* 19(8):1949–55.
108. Levine B, Klionsky DJ. Autophagy wins the 2016 Nobel Prize in Physiology or Medicine: Breakthroughs in baker's yeast fuel advances in biomedical research. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 114(2):201–5.
109. He Y, Li S, Zhang W, Dai W, Cui T, Wang G, Gao T, Li C. Dysregulated autophagy increased melanocyte sensitivity to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in vitiligo. *Sci Rep.* 7.
110. Wang G, Zhang T, Sun W, Wang H, Yin F, Wang Z, Zuo D, Sun M, Zhou Z, Lin B, Xu J, Hua Y, Li H, Cai Z. Arsenic sulfide induces apoptosis and autophagy through the activation of ROS/JNK and suppression of Akt/mTOR signaling pathways in osteosarcoma. *Free Radic Biol Med.* 106:24–37.
111. Liu C, Mo L, Niu Y, Li X, Zhou X, Xu X. The role of reactive oxygen species and autophagy in periodontitis and their potential linkage. *Front Physiol.* 8(JUN):1–13.
112. Zhong Z, Sanchez-Lopez E, Karin M. Autophagy, Inflammation, and Immunity: A Troika Governing Cancer and Its Treatment. *Cell.* 166(2):288–98.
113. Tsuda H, Ochiai K, Suzuki N, Otsuka K. Butyrate, a bacterial metabolite, induces apoptosis and autophagic cell death in gingival epithelial cells. *J Periodontol Res.* 45(5):626–34.
114. An Y, Liu W, Xue P, Zhang Y, Wang Q, Jin Y. Increased autophagy is required to protect periodontal ligament stem cells from apoptosis in inflammatory microenvironment. *J Clin Periodontol.* 43(7):618–25.
115. Park MH, Jeong SY, Na HS, Chung J. *Porphyromonas gingivalis* induces autophagy in THP-1-derived macrophages. *Mol Oral Microbiol.* 32(1):48–59.
116. Zhang L, Wang K, Lei Y, Li Q, Nice EC, Huang C. Redox signaling: Potential arbitrator of autophagy and apoptosis in therapeutic response. *Free Radic Biol Med.* 89:452–65.
117. Filomeni G, De Zio D, Cecconi F. Oxidative stress and autophagy: The clash between damage and metabolic needs. *Cell Death Differ.* 22(3):377–88.
118. Perrone S, Bracciali C, Di Virgilio N, Buonocore G. Oxygen Use in Neonatal Care: A Two-edged Sword. *Front Pediatr.* 4.

119. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 552(2):335–44.
120. Lismont C, Nordgren M, Van Veldhoven PP, Fransen M. Redox interplay between mitochondria and peroxisomes. *Front Cell Dev Biol.* 3(MAY).
121. Venditti P, Di Stefano L, Di Meo S. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Mitochondrion.* 13(2):71–82.
122. Galli C, Passeri G, Macaluso GM. FoxOs, Wnts and oxidative stress-induced bone loss: New players in the periodontitis arena? *J Periodontal Res.* 46(4):397–406.
123. Hajishengallis G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: Keystones, pathobionts, and host response. *Trends Immunol.* 35(1):3–11.
124. Wright CJ, Xue P, Hirano T, Liu C, Whitmore SE, Hackett M, Lamont RJ. Characterization of a bacterial tyrosine kinase in *Porphyromonas gingivalis* involved in polymicrobial synergy. *Microbiologyopen.* 3(3):383–94.
125. Lamont RJ, Hajishengallis G. Polymicrobial synergy and dysbiosis in inflammatory disease. *Trends Mol Med.* 21(3):172–83.
126. Sheikhi M, Gustafsson A, Jarstrand C. Cytokine, elastase and oxygen radical release by *Fusobacterium nucleatum*-activated leukocytes: A possible pathogenic factor in periodontitis. *J Clin Periodontol.* 27(10):758–62.
127. Lamont RJ. Hydrogen peroxide is a central determinant of oral polymicrobial synergy. *Environ Microbiol.* 18(11):3609–11.
128. Shin JE, Baek KJ, Choi YS, Choi Y. A periodontal pathogen *Treponema denticola* hijacks the *Fusobacterium nucleatum*-driven host response. *Immunol Cell Biol.* 91(8):503–10.
129. Almerich-Silla JM, Montiel-Company JM, Pastor S, Serrano F, Puig-Silla M, Dasí F. Oxidative Stress Parameters in Saliva and Its Association with Periodontal Disease and Types of Bacteria. *Dis Markers.* 2015.
130. Choe Y, Yu JY, Son YO, Park SM, Kim JG, Shi X, Lee JC. Continuously generated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulates the proliferation and osteoblastic differentiation of human periodontal ligament fibroblasts. *J Cell Biochem.* 113(4):1426–36.
131. Eun MC, Kim GH, Yong SL. *Atractylodes japonica* root extract protects osteoblastic MC3T3-E1 cells against hydrogen peroxide-induced inhibition of osteoblastic differentiation. *Phyther Res.* 23(11):1537–42.

132. Burdon RH, Gill V, Allianganana D. Hydrogen peroxide in relation to proliferation and apoptosis in BHK-21 hamster fibroblasts. *Free Radic Res.* 24(2):81–93.
133. Zhang CZ, Cheng XQ, Li JY, Zhang P, Yi P, Xu X, Zhou XD. Saliva in the diagnosis of diseases. *Int J Oral Sci.* 8(3):133–7.
134. Evin A, Gamsiz-Isik H, Cifcibasi E, Yalcin F. Plasma and salivary total antioxidant capacity in healthy controls compared with aggressive and chronic periodontitis patients. *Saudi Med J.* 36(7):856–61.
135. Tsai CC, Chen HS, Chen SL, Ho YP, Ho KY, Wu YM, Hung CC. Lipid peroxidation: A possible role in the induction and progression of chronic periodontitis. *J Periodontal Res.* 40(5):378–84.
136. Nguyen TT, Ngo LQ, Promsudthi A, Surarit R. Salivary oxidative stress biomarkers in chronic periodontitis and acute coronary syndrome. *Clin Oral Investig.* 21(7):2345–53.
137. Takane M, Sugano N, Iwasaki H, Iwano Y, Shimizu N, Ito K. New Biomarker Evidence of Oxidative DNA Damage in Whole Saliva From Clinically Healthy and Periodontally Diseased Individuals. *J Periodontol.* 73(5):551–4.
138. Battino M, Bullon P, Wilson M, Newman H. Oxidative injury and inflammatory periodontal diseases: The challenge of anti-oxidants to free radicals and reactive oxygen species. *Crit Rev Oral Biol Med.* 10(4):458–76.
139. Çanakçı CF, Çanakçı V, Tatar A, Eltas A, Sezer U, Çiçek Y, Oztas S. Increased salivary level of 8-hydroxydeoxyguanosine is a marker of premature oxidative mitochondrial DNA damage in gingival tissue of patients with periodontitis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 57(3):205–11.
140. Su H, Gornitsky M, Velly AM, Yu H, Benarroch M, Schipper HM. Salivary DNA, lipid, and protein oxidation in nonsmokers with periodontal disease. *Free Radic Biol Med.* 46(7):914–21.
141. Morgan MJ, Liu ZG. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- $\kappa$ B signaling. *Cell Res.* 21(1):103–15.
142. Nakano H, Nakajima A, Sakon-Komazawa S, Piao JH, Xue X, Okumura K. Reactive oxygen species mediate crosstalk between NF- $\kappa$ B and JNK. *Cell Death Differ.* 13(5):730–7.
143. Zhou R, Tardivel A, Thorens B, Choi I, Tschopp J. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol.*



- 11(2):136–40.
144. Özcan E, Saygun NI, Ilıkçı R, Karshoğlu Y, Muşabak U, Yeşillik S. Increased visfatin expression is associated with nuclear factor-kappa B and phosphatidylinositol 3-kinase in periodontal inflammation. *Clin Oral Investig.* 21(4):1113–21.
  145. Hans M, Hans VM. Toll-like receptors and their dual role in periodontitis: a review. *J Oral Sci.* 53(3):263–71.
  146. Nikhil K, Sharan S, Roy P. A pterostilbene derivative suppresses osteoclastogenesis by regulating RANKL-mediated NFκB and MAPK signaling in RAW264.7 cells. *Pharmacol Reports.* 67(6):1264–72.
  147. Thummuri D, Jeengar MK, Shrivastava S, Nemani H, Ramavat RN, Chaudhari P, Naidu VGM. Thymoquinone prevents RANKL-induced osteoclastogenesis activation and osteolysis in an in vivo model of inflammation by suppressing NF-KB and MAPK Signalling. *Pharmacol Res.* 99:63–73.
  148. Wang Q, Sztukowska M, Ojo A, Scott DA, Wang H, Lamont RJ. FOXO responses to *Porphyromonas gingivalis* in epithelial cells. *Cell Microbiol.* 17(11):1605–17.
  149. Kang SW, Park HJ, Ban JY, Chung JH, Chun GS, Cho JO. Effects of nicotine on apoptosis in human gingival fibroblasts. *Arch Oral Biol.* 56(10):1091–7.
  150. Schroder K, Zhou R, Tschopp J. The NLRP3 inflammasome: A sensor for metabolic danger? *Science (80- ).* 327(5963):296–300.
  151. Bostanci N, Emingil G, Saygan B, Turkoglu O, Atilla G, Curtis MA, Belibasakis GN. Expression and regulation of the NALP3 inflammasome complex in periodontal diseases. *Clin Exp Immunol.* 157(3):415–22.
  152. Canakci CF, Cicek Y, Canakci V. Reactive oxygen species and human inflammatory periodontal diseases. *Biokhimiya.* 70(6):751–61.
  153. Bolaman Z, Demir S, Köseoğlu M, Enli Y, Kadıköylü G, Aslan D. Multipl myelomalı hastalarda lipid peroksidasyonu (ön çalışma). 1(3):13–5.
  154. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 95(2):351–8.
  155. Sheikhi M, Bouhafis RKL, Hammarström KJ, Jarstrand C. Lipid peroxidation caused by oxygen radicals from fusobacterium-stimulated neutrophils as a possible model for the emergence of periodontitis. *Oral Dis.* 7(1):41–6.

156. Kimura S, Yonemura T, Kaya H. Increased oxidative product formation by peripheral blood polymorphonuclear leukocytes in human periodontal diseases. *J Periodontal Res.* 28(3):197–203.
157. Marton IJ, Balla G, Hegedus C, Redl P, Szilagyi Z, Karmazsin L, Kiss C. The role of reactive oxygen intermediates in the pathogenesis of chronic apical periodontitis. *Oral Microbiol Immunol.* 8(4):254–7.
158. Guarnieri C, Zucchelli G, Bernardi F, Scheda M, Valentini AF, Calandriello M. Enhanced superoxide production with on change of the antioxidant activity in gingival fluid of patients with chronic adult periodontitis. *Free Radic Res.* 15(1):11–6.
159. Aust SD, Morehouse LA, Thomas CE. Role of metals in oxygen radical reactions. *J Free Radicals Biol Med.* 1(1):3–25.
160. Larjava H. Fibroblasts-bacteria interactions. *Proc Finn Dent Soc.* 83(3):85–93.
161. Bartold PM, Wiebkin and OW, Thonard JC. The effect of oxygen-derived free radicals on gingival proteoglycans and hyaluronic acid. *J Periodontal Res.* 19(4):390–400.
162. Simon RH, Scoggin CH, Patterson D. Hydrogen peroxide causes the fatal injury to human fibroblasts exposed to oxygen radicals. *J Biol Chem.* 256(14):7181–6.
163. Murrell GAC, Francis MJO, Bromley L. Fibroblasts release superoxide free radicals. *Biochem Soc Trans.* 17(3):483–4.
164. Moseley R, Waddington RJ, Embery G, Rees SG. The modification of alveolar bone proteoglycans by reactive oxygen species in vitro. *Connect Tissue Res.* 37(1–2):13–28.
165. Petersen S V., Oury TD, Ostergaard L, Valnickova Z, Wegrzyn J, Thøgersen IB, Jacobsen C, Bowler RP, Fattman CL, Crapo JD, Enghild JJ. Extracellular Superoxide Dismutase (EC-SOD) Binds to Type I Collagen and Protects Against Oxidative Fragmentation. *J Biol Chem.* 279(14):13705–10.
166. Dahiya P, Kamal R, Gupta R, Bhardwaj R, Chaudhary K, Kaur S. Reactive oxygen species in periodontitis. *J Indian Soc Periodontol.* 17(4):411–6.
167. Halliwell B. How to characterize an antioxidant: an update. Vol. 61, *Biochemical Society symposium.* Biochem Soc Symp; 1995. p. 73–101.
168. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: Some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys.*

- 246(2):501–14.
169. Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods Enzymol.* 186(C):1–85.
  170. Adonogianaki E, Moughal NA, Mooney J, Stirrups DR, Kinane DF. Acute-phase proteins in gingival crevicular fluid during experimentally induced gingivitis. *J Periodontol Res.* 29(3):196–202.
  171. Niedowicz DM, Daleke DL. The role of oxidative stress in diabetic complications. *Cell Biochem Biophys.* 43(2):289–330.
  172. Demple B, Harrison L. Repair of oxidative damage to DNA: Enzymology and biology. Vol. 63, *Annual Review of Biochemistry.* Annu Rev Biochem; 1994. p. 915–48.
  173. Hancock JT, Desikan R, Neill SJ. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochem Soc Trans.* 29(2):345–50.
  174. Babior BM, Kipnes RS, Cumvu JT. The Production By Leukocytes of Superoxide, a Potential Bactericidal Agent. *Biol Def Mech.* 52(March):741–4.
  175. Zhu XQ, Lu W, Chen Y, Cheng XF, Qiu JY, Xu Y, Sun Y. Effects of *Porphyromonas gingivalis* Lipopolysaccharide Tolerized Monocytes on Inflammatory Responses in Neutrophils. *PLoS One.* 11(8).
  176. Kim PKM, Zamora R, Petrosko P, Billiar TR. The regulatory role of nitric oxide in apoptosis. *Int Immunopharmacol.* 1(8):1421–41.
  177. Kendall H, Marshall R, Bartold P. Nitric oxide and tissue destruction. *Oral Dis.* 7(1):2–10.
  178. Jarnbring F, Somogyi E, Dalton J, Gustafsson A, Klinge B. Quantitative assessment of apoptotic and proliferative gingival keratinocytes in oral and sulcular epithelium in patients with gingivitis and periodontitis. *J Clin Periodontol.* 29(12):1065–71.
  179. Demirci F, Baser KHC, Calis I, Gokhan E. Essential oil and antimicrobial evaluation of the pistacia eurycarpa. *Khimiya Prir Soedin.* 37(4):282–4.
  180. Erdoğan MK, Agca CA, Askin H. Enhanced antiproliferative and apoptotic effects of 5-fluorouracil by combined with Pistacia eurycarpa Extracts on human colorectal cancer cells. *Biol Divers Conserv.* 12(1):27–38.
  181. AL-Saghir MG, Porter DM. Taxonomic Revision of the Genus Pistacia L. (Anacardiaceae). *Am J Plant Sci.* 03(01):12–32.

182. Kafkas E, Kurkcuoglu M, Kafkas S, Baser KHC. Analysis of the fatty oil of *Pistacia eurycarpa* nuts by gas chromatography/mass spectrometry. *Chem Nat Compd.* 43(3):313–4.
183. Magiatis P, Melliou E, Skaltsounis AL, Chinou IB, Mitaku S. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Pistacia lentiscus* var. *chia*. *Planta Med.* 65(8):749–52.
184. Castola V, Bighelli A, Casanova J. Intraspecific chemical variability of the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from Corsica. *Biochem Syst Ecol.* 28(1):79–88.
185. Tahvilian R, Moradi R, Zhale H, Zangeneh MM, Zangeneh A, Yazdani H, Hajialiani M. Ethnomedicinal Plants: In vitro antibacterial effect of essential oil of *Pistacia khinjuk*. 7(10):437–47.
186. Almirall M, Montaña J, Escribano E, Obach R, Berrozpe JD. Effect of d-limonene, alpha-pinene and cineole on in vitro transdermal human skin penetration of chlorpromazine and haloperidol. *Arzneimittelforschung.* 46(7):676–80.
187. Alma MH, Nitz S, Kollmannsberger H, Digrak M, Efe FT, Yilmaz N. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from the gum of Turkish Pistachio (*Pistacia vera* L.). *J Agric Food Chem.* 52(12):3911–4.
188. Khoshnazar M, Parvardeh S, Bigdeli MR. Alpha-pinene exerts neuroprotective effects via anti-inflammatory and anti-apoptotic mechanisms in a rat model of focal cerebral ischemia-reperfusion. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 29(8):104977.
189. Rufino AT, Ribeiro M, Judas F, Salgueiro L, Lopes MC, Cavaleiro C, Mendes AF. Anti-inflammatory and Chondroprotective Activity of (+)- $\alpha$ -Pinene: Structural and Enantiomeric Selectivity. *J Nat Prod.* 77(2):264–9.
190. Zhou J, Tang F, Mao G, Bian R. Effect of alpha-pinene on nuclear translocation of NF-kappa B in THP-1 cells. *Acta Pharmacol Sin.* 25(4):480–4.
191. Salehi B, Upadhyay S, Orhan IE, Jugran AK, Jayaweera SLD, Dias DA, Sharopov F, Taheri Y, Martins N, Baghalpour N, Cho WC, Sharifi-Rad J. Therapeutic potential of  $\alpha$ - and  $\beta$ -pinene: A miracle gift of nature. *Biomolecules.* 9(11):1–34.
192. Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Animal models for periodontal regeneration and peri-implant responses. *Periodontol 2000.* 68(1):66–82.

193. Uslu MÖ, Kırmızıgül ÖA, Öğütücü U. Periodontolojide Deney Hayvani Ve Hastalık Modelleri. Atatürk Üniversitesi Diş Hekim Fakültesi Derg.
194. Graves DT, Fine D, Teng YTA, Van Dyke TE, Hajishengallis G. The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 35(2):89–105.
195. Kolenbrander PE, Palmer RJ, Periasamy S, Jakubovics NS. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nat Rev Microbiol.* 8(7):471–80.
196. Freire MO, Sedghizadeh PP, Schaudinn C, Gorur A, Downey JS, Choi J-H, Chen W, Kook J-K, Chen C, Goodman SD, Zadeh HH. Development of an Animal Model for *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* Biofilm-Mediated Oral Osteolytic Infection: A Preliminary Study . *J Periodontol.* 82(5):778–89.
197. Arulampalam V, Greicius G, Pettersson S. The long and winding road to gut homeostasis. *Curr Opin Gastroenterol.* 22(4):349–53.
198. Struillou X, Boutigny H, Soueidan A, Layrolle P. Experimental Animal Models in Periodontology: A Review. *Open Dent J.* 4(1):37–47.
199. Bhardwaj A, Bhardwaj S. Contribution of Animal Models in Periodontal Research. *Int J Agro Vet Med Sci.* 6:150–7.
200. Schou S, Holmstrup P, Kornman KS. Non-Human Primates Used in Studies of Periodontal Disease Pathogenesis: A Review of the Literature. *J Periodontol.* 64(6):497–508.
201. Page RC, Schroeder HE. Periodontitis in Man and Other Animals. *Can Vet J = La Rev Vet Can.* 24(1):23–23.
202. Oz HS, Puleo DA. Animal models for periodontal disease. *J Biomed Biotechnol.* 2011:1–8.
203. de Molon RS ca., de Avila ED origatt., Cirelli JA ugust. Host responses induced by different animal models of periodontal disease: a literature review. *J Investig Clin Dent.* 4(4):211–8.
204. de Molon RS, Mascarenhas VI, de Avila ED, Finoti LS, Toffoli GB, Spolidorio DMP, Scarel-Caminaga RM, Tetradis S, Cirelli JA. Long-term evaluation of oral gavage with periodontopathogens or ligature induction of experimental periodontal disease in mice. *Clin Oral Investig.* 20(6):1203–16.
205. Bezerra MM, Brito GAC, Ribeiro RA, Rocha FAC. Low-dose doxycycline

- prevents inflammatory bone resorption in rats. *Brazilian J Med Biol Res.* 35(5):613–6.
206. Matsuda Y, Kato T, Takahashi N, Nakajima M, Arimatsu K, Minagawa T, Sato K, Ohno H, Yamazaki K. Ligature-induced periodontitis in mice induces elevated levels of circulating interleukin-6 but shows only weak effects on adipose and liver tissues. *J Periodontal Res.* 51(5):639–46.
207. de Molon RS, de Avila ED, Boas Nogueira AV, Chaves de Souza JA, Avila-Campos MJ, de Andrade CR, Cirelli JA. Evaluation of the Host Response in Various Models of Induced Periodontal Disease in Mice. *J Periodontol.* 85(3):465–77.
208. Li CH, Amar S. Morphometric, Histomorphometric, and Microcomputed Tomographic Analysis of Periodontal Inflammatory Lesions in a Murine Model. *J Periodontol.* 78(6):1120–8.
209. de Molon RS, Park CH, Jin Q, Sugai J, Cirelli JA. Characterization of ligature-induced experimental periodontitis. *Microsc Res Tech.* 81(12):1412–21.
210. Takayanagi H, Kim S, Matsuo K, Suzuki H, Suzuki T, Sato K, Yokochi T, Oda H, Nakamura K, Ida N, Wagner EF, Taniguchi T. RANKL maintains bone homeostasis through c-fos-dependent induction of interferon- $\beta$ . *Nature.* 416(6882):744–9.
211. De Souza JAC, Nogueira AVB, De Souza PPC, Cirelli JA, Garlet GP, Rossa C. Expression of suppressor of cytokine signaling 1 and 3 in ligature-induced periodontitis in rats. *Arch Oral Biol.* 56(10):1120–8.
212. Azeez SH, Gaphor SM, Sha AM, Garib BT. Effect of Pistacia atlantica subsp. kurdica Gum in Experimental Periodontitis Induced in Wistar Rats by Utilization of Osteoclastogenic Bone Markers. *Molecules.* 25(24):5819.
213. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem.* 38(12):1103–11.
214. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem.* 37(2):112–9.
215. Kara M, Kesim S, Aral CA, Elmali F. Effect of grape seed extract upon plasma oxidative status and alveolar bone, in ligature induced periodontitis. *Biotechnol Biotechnol Equip.* 27(5):4131–6.
216. Kumar P, Ansari S, Ali J. Herbal Remedies for the Treatment of Periodontal

- Disease - A Patent Review. *Recent Pat Drug Deliv Formul.* 3(3):221–8.
217. Petersen PE, Ogawa H. The global burden of periodontal disease: Towards integration with chronic disease prevention and control. *Periodontol* 2000. 60(1):15–39.
218. Dumitrescu AL. Editorial: Periodontal Disease – A Public Health Problem. *Front Public Heal.* 3.
219. Solowiej-Wedderburn J, Ide M, Pennington M. Cost-effectiveness of non-surgical periodontal therapy for patients with type 2 diabetes in the UK. *J Clin Periodontol.* 44(7):700–7.
220. Holt SC, Ebersole JL. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the “red complex”, a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol* 2000. 38(1):72–122.
221. Waddington RJ, Moseley R, Embery G. Reactive oxygen species: A potential role in the pathogenesis of periodontal diseases. *Oral Dis.* 6(3):138–51.
222. Kowashi Y, Jaccard F, Cimasoni G. Sulcular polymorphonuclear leucocytes and gingival exudate during experimental gingivitis in man. *J Periodontal Res.* 15(2):151–8.
223. Ionel A, Lucaciu O, Tăbăran F, Berce C, Toader S, Hurubeanu L, Bondor C, Cămpian RS. Histopathological and clinical expression of periodontal disease related to the systemic inflammatory response. *Histol Histopathol.* 32(4):379–84.
224. Bretz WA, Weyant RJ, Corby PM, Ren D, Weissfeld L, Kritchevsky SB, Harris T, Kurella M, Satterfield S, Visser M, Newman AB. Systemic Inflammatory Markers, Periodontal Diseases, and Periodontal Infections in an Elderly Population. *J Am Geriatr Soc.* 53(9):1532–7.
225. Weinberg MA, Bral M. Laboratory animal models in periodontology. *J Clin Periodontol.* 26(6):335–40.
226. Uslu MÖ. Deneysel Periodontitisli Ratlarda Diş Yüzeyi Temizliği ve Kök Yüzeyi Düzleştirilmesine İlaven Uygulanan Diyet Lazer Uygulamasının Histomorfometrik ve Biyokimyasal Parametreler Üzerine Etkileri. İnönü Üniversitesi Sağlık Bilim Enstitüsü, Periodontoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi, Mal İnönü Üniversitesi, 2014.
227. Tyrrell KL, Citron DM, Jenkins JR, Goldstein EJC. Periodontal Bacteria in Rabbit Mandibular and Maxillary Abscesses. *J Clin Microbiol.* 40(3):1044–7.

228. Oortgiesen DAW, Meijer GJ, Bronckers ALJJ, Walboomers XF, Jansen JA. Fenestration Defects in the Rabbit Jaw: An Inadequate Model for Studying Periodontal Regeneration. *Tissue Eng Part C Methods*. 16(1):133–40.
229. Kostić M, Kitić D, Petrović MB, Jevtović-Stoimenov T, Jović M, Petrović A, Živanović S. Anti-inflammatory effect of the *Salvia sclarea* L. ethanolic extract on lipopolysaccharide-induced periodontitis in rats. *J Ethnopharmacol*. 199:52–9.
230. Madden TE, Caton JG. [9] Animal models for periodontal disease. In 1994. p. 106–19.
231. Jeong-Hyon K, Bon-Hyuk G, Sang-Soo N, Yeon-Cheol P. A review of rat models of periodontitis treated with natural extracts. *J Tradit Chinese Med Sci*. 7(2):95–103.
232. Toker H, Ozan F, Ozer H, Ozdemir H, Eren K, Yeler H. A Morphometric and Histopathologic Evaluation of the Effects of Propolis on Alveolar Bone Loss in Experimental Periodontitis in Rats. *J Periodontol*. 79(6):1089–94.
233. Yoshinaga K, Hawkins RA, Stocker JF. Estrogen Secretion by the Rat Ovary in Vivo During the Estrous Cycle and Pregnancy. *Endocrinology*. 85(1):103–12.
234. Yoon K-H, Cho D-C, Yu S-H, Kim K-T, Jeon Y, Sung J-K. The Change of Bone Metabolism in Ovariectomized Rats: Analyses of MicroCT Scan and Biochemical Markers of Bone Turnover. *J Korean Neurosurg Soc*. 51(6):323.
235. Deyhim F, Stoecker BJ, Bruswitz GH, Arjmandi BH. The effects of estrogen depletion and isoflavones on bone metabolism in rats. *Nutr Res*. 23(1):123–30.
236. Cruess RL, Hong KC. The Effect of Long Term Estrogen Administration on Bone Metabolism in the Female Rat\*. *Endocrinology*. 104(4):1188–93.
237. Shors TJ, Pickett J, Wood G, Paczynski M. Acute Stress Persistently Enhances Estrogen Levels in the Female Rat. *Stress*. 3(2):163–71.
238. Jönsson D. The biological role of the female sex hormone estrogen in the periodontium--studies on human periodontal ligament cells. *Swed Dent J Suppl*. (187):11–54.
239. Graves DT, Kang J, Andriankaja O, Wada K, Rossa Jr C. Animal Models to Study Host-Bacteria Interactions Involved in Periodontitis. In 2011. p. 117–32.
240. Mustafa H, C.H. C, Radzi R, Fong LS, Mustapha NM, Dyary HO. Induction of periodontal disease via retentive ligature, lipopolysaccharide injection and their combination in a rat model. *Pol J Vet Sci*. 24(3):365–73.



241. Cirelli JA, Park CH, MacKool K, Taba M, Lustig KH, Burstein H, Giannobile W V. AAV2/1-TNFR:Fc gene delivery prevents periodontal disease progression. *Gene Ther.* 16(3):426–36.
242. de Souza JAC, Nogueira AVB, de Souza PPC, Cirelli JA, Garlet GP, Rossa C. Expression of suppressor of cytokine signaling 1 and 3 in ligature-induced periodontitis in rats. *Arch Oral Biol.* 56(10):1120–8.
243. De Lima V, Bezerra MM, De Menezes Alencar VB, Portela Vidal FD, Castro Da Rocha FA, De Castro Brito GA, Ribeiro RDA. Effects of chlorpromazine on alveolar bone loss in experimental periodontal disease in rats. *Eur J Oral Sci.* 108(2):123–9.
244. Kuhr A, Popa-Wagner A, Schmoll H, Schwahn C, Kocher T. Observations on experimental marginal periodontitis in rats. *J Periodontal Res.* 39(2):101–6.
245. Ara T, Nakatani S, Kobata K, Sogawa N, Sogawa C. The Biological Efficacy of Natural Products against Acute and Chronic Inflammatory Diseases in the Oral Region. *Medicines.* 5(4):122.
246. Kalembe D, Kunicka A. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. *Curr Med Chem.* 10(10):813–29.
247. Mahmoudi M, Ebrahimzadeh MA, Nabavi SFM, Hafezi S, Nabavi SFM, Eslami SH. Antiinflammatory and antioxidant activities of gum mastic. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 14(9):765–9.
248. Heidarian E, Jafari-Dehkordi E, Valipour P, Ghatreh-Samani K, Ashrafi-Eshkaftaki L. Nephroprotective and Anti-Inflammatory Effects of *Pistacia atlantica* Leaf Hydroethanolic Extract Against Gentamicin-Induced Nephrotoxicity in Rats. *J Diet Suppl.* 14(5):489–502.
249. Tanideh N, Masoumi S, Hosseinzadeh M, Safarpour AR, Erjaee H, Koochi-Hosseinzadeh O, Rahimikazerooni S. Healing effect of *pistacia atlantica* fruit oil extract in acetic acid-induced colitis in rats. *Iran J Med Sci.* 39(6):522–8.
250. Graves D. Cytokines That Promote Periodontal Tissue Destruction. *J Periodontol.* 79(8s):1585–91.
251. Nibali L. Aggressive Periodontitis: microbes and host response, who to blame? *Virulence.* 6(3):223–8.
252. Silva N, Abusleme L, Bravo D, Dutzan N, Garcia-Sesnich J, Vernal R, Hernandez M, Gamonal J. Host response mechanisms in periodontal diseases. *J*

- Appl Oral Sci. 23(3):329–55.
253. Williams RC, Jeffcoat MK, Kaplan ML, Goldhaber P, Johnson HG, Wechter WJ. Flurbiprofen: A potent inhibitor of alveolar bone resorption in beagles. *Science* (80- ). 227(4687):640–2.
  254. Assuma R, Oates T, Cochran D, Amar S, Graves DT. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *J Immunol.* 160(1):403–9.
  255. Lee H-J, Kang I-K, Chung C-P, Choi S-M. The subgingival microflora and gingival crevicular fluid cytokines in refractory periodontitis. *J Clin Periodontol.* 22(11):885–90.
  256. Chiang C-Y, Kyritsis G, Graves DT, Amar S. Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor Activities Partially Account for Calvarial Bone Resorption Induced by Local Injection of Lipopolysaccharide. McGhee JR, editor. *Infect Immun.* 67(8):4231–6.
  257. Koide M, Suda S, Saitoh S, Ofuji Y, Suzuki T, Yoshie H, Takai M, Ono Y, Taniguchi Y, Hara K. In vivo administration of IL-1beta accelerates silk ligature-induced alveolar bone resorption in rats. *J Oral Pathol Med.* 24(9):420–34.
  258. Toker H, Poyraz O, Eren K. Effect of periodontal treatment on IL-1 $\beta$ , IL-1ra, and IL-10 levels in gingival crevicular fluid in patients with aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol.* 35(6):507–13.
  259. Fu Q-Y, Zhang L, Duan L, Qian S-Y, Pang H-X. Correlation of chronic periodontitis in tropical area and IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-17 levels. *Asian Pac J Trop Med.* 6(6):489–92.
  260. Sasaki H, Okamatsu Y, Kawai T, Kent R, Taubman M, Stashenko P. The interleukin-10 knockout mouse is highly susceptible to *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone loss. *J Periodontal Res.* 39(6):432–41.
  261. Al-Rasheed A, Scheerens H, Srivastava AK, Rennick DM, Tatakis DN. Accelerated alveolar bone loss in mice lacking interleukin-10: late onset. *J Periodontal Res.* 39(3):194–8.
  262. Lappin DF, Macleod CP, Kerr A, Mitchell T, Kinane DF. Anti-inflammatory cytokine IL-10 and T cell cytokine profile in periodontitis granulation tissue. *Clin Exp Immunol.* 123(2):294–300.
  263. Hirose M, Ishihara K, Saito A, Nakagawa T, Yamada S, Okuda K. Expression of

- Cytokines and Inducible Nitric Oxide Synthase in Inflamed Gingival Tissue. *J Periodontol.* 72(5):590–7.
264. Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A. Levels of Interleukin-1 $\beta$ , -8, and -10 and RANTES in Gingival Crevicular Fluid and Cell Populations in Adult Periodontitis Patients and the Effect of Periodontal Treatment. *J Periodontol.* 71(10):1535–45.
  265. Bhabak KP, Mugesh G. Functional Mimics of Glutathione Peroxidase: Bioinspired Synthetic Antioxidants. *Acc Chem Res.* 43(11):1408–19.
  266. Patel SP, Rao NS, Pradeep AR. Effect of nonsurgical periodontal therapy on crevicular fluid and serum glutathione peroxidase levels. *Dis Markers.* 32(1):1–7.
  267. Carlsson J, Larsen JT, Edlund M-B. Peptostreptococcus micros has a uniquely high capacity to form hydrogen sulfide from glutathione. *Oral Microbiol Immunol.* 8(1):42–5.
  268. Wei P-F, Ho K-Y, Ho Y-P, Wu Y-M, Yang Y-H, Tsai C-C. The investigation of glutathione peroxidase, lactoferrin, myeloperoxidase and interleukin-1 $\beta$  in gingival crevicular fluid: implications for oxidative stress in human periodontal diseases. *J Periodontal Res.* 39(5):287–93.
  269. Dhotre PS, Suryakar AN, Bhogade RB. Oxidative Stress in Periodontitis. *Electron J Gen Med.* 9(2).
  270. Hemashree J, Dharman S, Anon S. Evaluation of Malondialdehyde, Glutathione Peroxidase and Defensin Levels in Patients with and without Periodontitis. *Indian J Public Heal Res Dev.* 11(1):246.
  271. Akalın FA, Baltacıoğlu E, Alver A, Karabulut E. Lipid peroxidation levels and total oxidant status in serum, saliva and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 34(7):558–65.
  272. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 15(4):316–28.
  273. Canakci CF, Cicek Y, Yildirim A, Sezer U, Canakci V. Increased Levels of 8-Hydroxydeoxyguanosine and Malondialdehyde and its Relationship with Antioxidant Enzymes in Saliva of Periodontitis Patients. *Eur J Dent.* 03(02):100–6.
  274. Ibrahim W, Lee U-S, Yen H-C, St. Clair DK, Chow CK. Antioxidant and

- oxidative status in tissues of manganese superoxide dismutase transgenic mice. *Free Radic Biol Med.* 28(3):397–402.
275. Ghallab N, Hamdy E, Shaker O. Malondialdehyde, superoxide dismutase and melatonin levels in gingival crevicular fluid of aggressive and chronic periodontitis patients. *Aust Dent J.* 61(1):53–61.
276. Sculley D V., Langley-Evans SC. Salivary antioxidants and periodontal disease status. *Proc Nutr Soc.* 61(1):137–43.
277. Akalin FA, Toklu E, Renda N. Analysis of superoxide dismutase activity levels in gingiva and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis and periodontally healthy controls. *J Clin Periodontol.* 32(3):238–43.
278. Rao A, Prasad B, Kumari S, Thomas B. Serum levels of antioxidants and superoxide dismutase in periodontitis patients with diabetes type 2. *J Indian Soc Periodontol.* 18(4):451.
279. Konopka T, Król K, Kopeć W, Gerber H. Total antioxidant status and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in gingival and peripheral blood of periodontitis patients. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 55(6):417–25.
280. Verma A, Tripathi V, Singh ST, Singh CD, Gill JS. Assessment of Lipid Peroxidation Levels and Total Antioxidant Status in Chronic and Aggressive Periodontitis Patients: An in vivo Study. *J Contemp Dent Pract.* 19(3):287–91.
281. Mashayekhi F, Aghahoseini F, Rezaie A, Zamani MJ, Khorasani R, Abdollahi M. Alteration of cyclic nucleotides levels and oxidative stress in saliva of human subjects with periodontitis. *J Contemp Dent Pract.* 6(4):46–53.
282. Narendra S, Das UK, Tripathy SK, Sahani NC. Superoxide Dismutase, Uric Acid, Total Antioxidant Status, and Lipid Peroxidation Assay in Chronic and Aggressive Periodontitis Patients. *J Contemp Dent Pract.* 19(7):874–80.
283. Benn DK. A review of the reliability of radiographic measurements in estimating alveolar bone changes. *J Clin Periodontol.* 17(1):14–21.
284. Bezerra MM, Lima V de, Alencar VBM, Vieira IB, Brito GAC, Ribeiro RA, Rocha FAC. Selective Cyclooxygenase-2 Inhibition Prevents Alveolar Bone Loss in Experimental Periodontitis in Rats. *J Periodontol.* 71(6):1009–14.
285. Demirer S, Kara MI, Erciyas K, Ozdemir H, Ozer H, Ay S. Effects of boric acid on experimental periodontitis and alveolar bone loss in rats. *Arch Oral Biol.* 57(1):60–5.

286. Jin Q, Cirelli JA, Park CH, Sugai J V., Taba M, Kostenuik PJ, Giannobile W V. RANKL Inhibition Through Osteoprotegerin Blocks Bone Loss in Experimental Periodontitis. *J Periodontol.* 78(7):1300–8.
287. Leitão RFC, Ribeiro RA, Chaves HV, Rocha FAC, Lima V, Brito GAC. Nitric Oxide Synthase Inhibition Prevents Alveolar Bone Resorption in Experimental Periodontitis in Rats. *J Periodontol.* 76(6):956–63.
288. Liu YF, Wu LA, Wang J, Wen LY, Wang XJ. Micro computerized tomography analysis of alveolar bone loss in ligature - and nicotine-induced experimental periodontitis in rats. *J Periodontal Res.* 45(6):714–9.
289. Bae SH, Ha MH, Choi E-Y, Choi J-I, Choi IS, Kim S-J. Effects of daidzein on alveolar bone loss and internal microstructures of bone in a rat model of experimental periodontitis: a study using micro-computed tomography. *J Periodontal Res.* 51(2):250–6.
290. Kaboosaya B, Wulansari LK, V.N TN, Aoki K, Kasugai S. Ligation Period Required to Induce Periodontitis in Mice: Analysis with Micro-computed Tomography. *J Oral Tissue Eng.* 15(1):25–34.
291. Park CH, Abramson ZR, Taba M, Jin Q, Chang J, Kreider JM, Goldstein SA, Giannobile W V. Three-Dimensional Micro-Computed Tomographic Imaging of Alveolar Bone in Experimental Bone Loss or Repair. *J Periodontol.* 78(2):273–81.
292. Aral CA, Aral K, Yay A, Özçoban Ö, Berdeli A, Saraymen R. Effects of colchicine on gingival inflammation, apoptosis, and alveolar bone loss in experimental periodontitis. *J Periodontol.* 89(5):577–85.
293. Chen H, Xu X, Liu M, Zhang W, Ke H, Qin A, Tang T, Lu E. Sclerostin antibody treatment causes greater alveolar crest height and bone mass in an ovariectomized rat model of localized periodontitis. *Bone.* 76:141–8.
294. Xu X chen, Chen H, Zhang X, Zhai Z jing, Liu X qiang, Qin A, Lu E yi. Simvastatin prevents alveolar bone loss in an experimental rat model of periodontitis after ovariectomy. *J Transl Med.* 12(1).
295. Jayakumar A, Rohini S, Naveen A, Haritha A, Reddy K. Horizontal alveolar bone loss: A periodontal orphan. *J Indian Soc Periodontol.* 14(3):181.
296. Fukuda CT, Carneiro SRS, Alves VTE, Pustiglioni FE, De Micheli G. Radiographic Alveolar Bone Loss in Patients Undergoing Periodontal

- Maintenance. Bull Tokyo Dent Coll. 49(3):99–106.
297. Hasheminya S-M, Dehghannya J. Composition, phenolic content, antioxidant and antimicrobial activity of *Pistacia atlantica* subsp. *kurdica* hulls' essential oil. Food Biosci. 34:100510.
  298. Gourine N, Yousfi M, Bombarda I, Nadjemi B, Gaydou E. Seasonal Variation of Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oil from *Pistacia atlantica* Desf. Leaves. J Am Oil Chem Soc. 87(2):157–66.
  299. Rezaie M, Farhoosh R, Sharif A, Asili J, Iranshahi M. Chemical composition, antioxidant and antibacterial properties of Bene (*Pistacia atlantica* subsp. *mutica*) hull essential oil. J Food Sci Technol. 52(10):6784–90.
  300. Wang C-Y, Chen Y-W, Hou C-Y. Antioxidant and antibacterial activity of seven predominant terpenoids. Int J Food Prop. 22(1):230–8.
  301. Memariani Z, Sharifzadeh M, Bozorgi M, Hajimahmoodi M, Farzaei MH, Gholami M, Siavoshi F, Saniee P. Protective effect of essential oil of *Pistacia atlantica* Desf. on peptic ulcer: Role of  $\alpha$ -pinene. J Tradit Chinese Med. 37(1):57–63.
  302. Roozegar M, Jalilian FA, Havasian M, Panahi J, Pakzad I. Antimicrobial effect of *Pistacia atlantica* leaf extract. Bioinformation. 12(1):19–21.
  303. Benhammou N, Bekkara FA, Panovska TK. Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. African J Pharm Pharmacol. 2(2):022–8.
  304. Smeriglio A, Denaro M, Barreca D, Calderaro A, Bisignano C, Ginestra G, Bellocco E, Trombetta D. In Vitro Evaluation of the Antioxidant, Cytoprotective, and Antimicrobial Properties of Essential Oil from *Pistacia vera* L. Variety Bronte Hull. Int J Mol Sci. 18(6):1212.
  305. Demir E. Kafeik Asit Fenetil Esterin Deneysel Periodontitiste Enflamasyona Olan Etkilerinin İncelenmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Periodontoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Samsun; 2016.
  306. Şengün MC. Deneysel Periodontitis Oluşturulan Sıçanlarda Hidroksitirozol'ün Alveolar Kemik Yıkımı ve Oksidatif Stres Parametrelerine Olan Etkisi. Diş Hekimliği Fakültesi, Periodontoloji Anabilim Dalı, Diş Hekimliğinde Uzmanlık Tezi, Bolu; 2018.
  307. Kırzioğlu FY, Tözüm Bulut M, Doğan B, Fentoğlu Ö, Özmen Ö, Çarsancaklı

- SA, Ergün AG, Özdem M, Orhan H. Anti-inflammatory effect of rosuvastatin decreases alveolar bone loss in experimental periodontitis. *J Oral Sci.* 59(2):247–55.
308. Aral CA, Kesim S, Greenwell H, Kara M, Çetin A, Yakan B. Alveolar Bone Protective and Hypoglycemic Effects of Systemic Propolis Treatment in Experimental Periodontitis and Diabetes Mellitus. *J Med Food.* 18(2):195–201.
309. Durmuş D. Deneysel Periodontitis Rat Modelinde Boswellic Asit ve Chebulagic Asit'in Etkileri. Diş Hekimliği Fakültesi, Periodontoloji Anabilim Dalı, Diş Hekimliğinde Uzmanlık Tezi, Zonguldak, Bülent Ecevit Üniversitesi; 2018.



## **EKLER**

### **EK - 1. ÖZGEÇMİŞ**





## EK - 2. HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ	KARAR SAYISI	HAYBİS KAYIT NO	BAŞVURU SAHİBİ
26.11.2020	2020/16-7	10179	Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Özay USLU

Deneyde Kullanılacak Hayvanın Türü	: Sıçan	<b>Araştırmacılar</b> 1. Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ 2. Arş. Gör. Mustafa ATALAY 3. Arş. Gör. Mehmet Sina İÇEN 4. Arş. Gör. Nuray ÜREMİŞ
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Soy	: <i>Wistar Albino</i>	
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Cinsiyeti	: Erkek	
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Sayısı	: 32	
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Yaşı ve Ağırlığı	: 12 Haftalık / 180 Gr.	

**KARAR:**  
"DeneySEL periodontitis oluşturulmuş ratlarda pistacia eurycarpa yalt. Uygulamasının periodontal kemik yıkımı ve oksidatif stres üzerine etkilerinin incelenmesi" başlıklı çalışma kapsamında kullanılacak deney hayvanlarında yapılacak girişimlerde araştırmacılar tarafından "hayvan kullanım etiği ilkelerine" uyulacağı beyan edilmiştir. Bu çerçevede, söz konusu araştırmacının Orman ve Su İşleri Bakanlığının 15 Şubat 2014 tarih ve 28914 sayılı Resmî Gazetede yayımlanan "Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik" hükümleri göz önüne alındığında çalışmanın etik açıdan uygun olduğuna; oy birliği ile karar verildi.

<b>BAŞKAN</b>	Doç. Dr. Suat TEKİN
---------------	---------------------

**ÜYELER**

Doç. Dr. Elif TAŞLIDERE Başkan Yardımcısı		Prof. Dr. Şengül YÜKSEL Üye	
Dr. Öğr. Üyesi Onural ÖZHAN Üye		Veteriner Hekim Engin KORKMAZ Üye	
Dr. Öğr. Üyesi Mustafa CANBOLAT Üye		Öğretmen Kaan Akın ÖZ Sivil Üye	
Avukat Mustafa Umut YALÇIN Sivil Üye			

İnönü Üniversitesi, Merkez Kampüsü 44280/MALATYA Tel: 0 422 3410660/ 1219