



T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ENDODONTİ ANABİLİM DALI

**MELATONİNİN DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN
PERİAPİKAL LEZYON ÜZERİNE ETKİSİ**

Dt. Erdal SARİTEKİN

DOKTORA TEZİ

I. DANIŞMAN

Doç. Dr. Bulem ÜREYEN KAYA

II. DANIŞMAN

Prof. Dr. Özlem ÖZMEN

**Bu Tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi tarafından 4074-D1-14 proje numarası ile desteklenmiştir**

Tez. No: 142

ISPARTA-2016

KABUL ve ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Endodonti Anabilim Dalı** **Doktora Programı** çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 07/06/2016

- Tez I. Danışman : Doç. Dr. Bulem ÜREYEN KAYA
Süleyman Demirel Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi
EndodontiAD. 
- Üye : Prof. Dr. Nimet GENÇOĞLU
Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Restoratif Diş Tedavisi
AD. 
- Üye : Prof. Dr. Nevin KARTAL
Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Restoratif Diş Tedavisi
AD. 
- Üye : Prof. Dr. Ayşe Diljin KEÇECİ
Süleyman Demirel Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi
EndodontiAD. 
- Üye : Yrd. Doç. Dr. Halil AŞÇI
Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi Farmakoloji AD. 

ONAY: Bu doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

.....
Enstitü Müdür

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

“Melatoninin Deneysel Olarak Oluşturulan Periapikal Lezyon Üzerine Etkisi” adlı Doktora tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Erdal SARITEKİN

Danışman

Doç. Dr. Bulem Üreyen KAYA

ÖNSÖZ

Bu çalışmada deney hayvanları üzerinde melatonin hormonunun periapikal lezyonlardaki kemik yıkımına etkileri farklı teknikler kullanılarak değerlendirilmiştir. Melatonin ile ilgili diş hekimliğinde az sayıda çalışma bulunurken, endodonti alanında ise periapikal lezyonlardaki etkilerini araştıran çalışma bulunmamaktadır.

Çalışmamızda periapikal lezyonlardaki kemik yıkımı histomorfometrik ve radyografik yöntemlerle değerlendirilirken, kemik yıkımında rolü olan IL-1 β , RANK, RANKL, OPG immünohistokimyasal yöntemler ile değerlendirilmiştir. Ayrıca osteoklast sayıları TRAP analizi, bakterilerin kök kanalı ve periapikal lezyonlara penetrasyon derecesi de Brown-Brenn boyama ile değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada hedeflenen sistemik melatonin uygulamasının periapikal kemik yıkımı üzerindeki olası etkilerini değerlendirmek ve endodontide kullanım alanlarını belirlemektir.

Bu çalışma 4076-D1-14 proje numarası ile Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Isparta, 2016



Kızım Arya'ya ithaf ediyorum...

Saygılarımla...

Isparta, 2016

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bana hocalık değil ablalık yapan, bu zorlu süreçte havlu atma noktasına geldiğim her seferde maddi ve manevi desteği ile beni ayağa kaldıran, benim için azim ve kararlılığın sözlükteki karşılığı olan danışman hocam **Doç. Dr. Bulem ÜREYEN KAYA**' ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Histolojik ve immünohistokimyasal değerlendirmelerin tüm aşamalarında teorik ve pratik destekleri için ikinci tez danışmanım **Prof. Dr. Özlem Özmen**' e, deney aşamalarında tecrübesi ve değerli bilgileri, pozitif enerjisi ve ürettiği çözüm yolları ile destek olan **Yrd. Doç. Dr. Halil Aşçı**' ya, fikir ve önerileri ile bana destek olan anabilim dalı başkanımız **Prof. Dr. Ayşe Diljin Keçeci**'ye, istatistik değerlendirmelerindeki yardımları için **Yrd. Doç. Dr. Özgür Koşkan**' a teşekkür ederim. Dert dinleyen, kıymet bilen, babacan hocam **Doç. Dr. Murat Maden**'e ve doktora eğitimime katkılarından dolayı **Doç. Dr. Nejdet Adanır**' a ve **Yrd. Doç. Dr. Feyza Özdemir Kısacık**' a teşekkür ederim.

Deney aşamalarındaki yardımlarından dolayı kıymetli arkadaşım **Dr. Dt. Emre Çiçek** ve **Arş. Gör. Fatma Nihan Cankara**' ya, lisans ve doktora eğitimim boyunca beni hiç yalnız bırakmayan, zekâsıyla her konuda bana destek olan, 13 yıllık can dostum, ahiretlik arkadaşım **Dt. Anıl Teke**'ye, yaşam enerjisi ve tertemiz kalbi ile beni motive eden, pampam **Emre Erik**'e, klinik tecrübelerinin yanında hayat tecrübesi ile de bana birçok şey katan, sevgili abim **Dr. Dt. Ahmet Savgat**' a, çalışmaktan mutluluk duyduğum Endodonti AD'daki tüm asistan arkadaşlarıma ve personele teşekkür ederim.

Tez projeme destek sağlayan Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim (No: 4076-D1-14).

Hayatım boyunca sevgi ve özverilerini eksik etmeden maddi ve manevi destekleri ile her zaman arkamda olan **aileme**, yüreğimi ve dünyamı, sevgileri ve sıcaklıkları ile dolduran, tezimin tamamlanmasındaki en büyük iki etken, biricik kızım **Arya** ve sevgili eşim **Dr. Dt. Ayşegül Sarıtekin**'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY SAYFASI	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
BEYAN	v
ÖNSÖZ	vi
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xvii
RESİMLER DİZİNİ	xviii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Apikal Periodontitis.....	3
2.1.1. Etiyoloji	4
2.1.2. Enfeksiyon: Mikroorganizma ve Konak Doku Arasındaki Denge.....	6
2.1.3. Patogenez.....	6
2.1.3.1. Doğal Bağışıklık Yanıtı.....	7
2.1.3.1.1. Özgün Doğal Bağışıklık Yanıtı	7
2.1.3.1.2. Özgün Olmayan Doğal Bağışıklık Yanıtı.....	8
2.1.3.2. Kazanılmış Özgün Bağışıklık Yanıtı	8
2.1.3.3. Nörojenik Enflamasyon	9
2.1.4. Apikal Periodontitis Tanısı	10
2.1.4.1. Klinik ve Histolojik Bulgular Arasındaki İlişki	10
2.1.4.2. Radyografik ve Histolojik Bulgular Arasındaki Korelasyon.....	11
2.1.5. Histopatoloji	12
2.1.6. Semptomatik Apikal Periodontitis.....	12
2.1.6.1. Hücre Biyolojisi	14
2.1.6.1.1. Mast Hücreleri.....	14
2.1.6.1.2. Endotel Hücreleri.....	14
2.1.6.1.3. PMN	15
2.1.6.1.4. Makrofajlar	16
2.1.6.1.5. Trombositler	17
2.1.6.1.6. NK Hücreler	17
2.1.6.2. Enflamatuar Medyatörler	18

2.1.6.2.1. IL-1	19
2.1.6.3. Klinik Özellikler.....	20
2.1.7. Aseptomatik Apikal Periodontitis: Apikal Granülom, Kronik Apikal Periodontitis	21
2.1.7.1. Hücre Biyolojisi	22
2.1.7.1.1. Makrofaj	22
2.1.7.1.2. Lenfositler.....	22
2.1.7.1.3. Dentritik Hücreler.....	23
2.1.7.1.4. Osteoklastlar ve Apikal Periodontitiste Kemik Yıkımı.....	23
2.1.7.1.5. Malessez Epitel Artıkları.....	27
2.1.7.1.6. Fibroblastlar.....	28
2.1.7.2. Histopatoloji.....	28
2.1.7.3. Klinik Özellikler.....	29
2.1.8. Aseptomatik Apikal Periodontitis: Radiküler Kist, Kronik Apikal Periodontitis	30
2.1.8.1. Hücre Biyolojisi	30
2.1.8.2. Enflamatuar Medyatorlar	32
2.1.8.3. Histopatoloji.....	32
2.1.8.4. Klinik Özellikler.....	32
2.2. Melatonin.....	32
2.2.1. Melatoninin Fizyolojisi ve Farmakolojisi.....	33
2.2.1.1. Melatoninin Vücuttan Uzaklaştırılması	35
2.2.1.2. Melatonin Kullanım Şekli, Dozu ve Zamanı	35
2.2.2. Melatoninin Biyolojik Etkileri.....	37
2.2.2.1. Melatonin Reseptörleri.....	37
2.2.2.2. Serbest Radikal Temizleme.....	37
2.2.2.3. Bağışıklık Sistemi Etkileri	38
2.2.2.4. Uyku ve Günlük Ritim Üzerine Etkileri	38
2.2.2.5. Cinsel Olgunluk ve Üreme Üzerine Etkileri	39
2.2.2.6. Yaşlanma Üzerine Etkileri	40
2.2.2.7. Kanser Üzerine Etkileri.....	41
2.2.2.8. Melatonin ve Kemik.....	41
2.2.3. Diş Hekimliğinde Melatonin	42

3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	44
3.1. Deney Hayvanları.....	45
3.2. Deney Grupları.....	48
3.3. Deneysel Periapikal Lezyon Oluşturulması.....	49
3.4. Melatonin ve Etanol Solüsyonlarının Hazırlanması ve Uygulanması.....	51
3.4.1. Melatonin Solüsyonunun Hazırlanması ve Doz Ayarlaması.....	53
3.4.2. Etanol Solüsyonunun Hazırlanması ve Doz Ayarlaması.....	59
3.5. Hayvanların Ötenazisi.....	59
3.6. Radyografik İnceleme.....	61
3.7. Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal Değerlendirme için Örneklerin Hazırlanması.....	62
3.8. Histopatolojik Değerlendirme.....	63
3.9. Histomorfometrik Değerlendirme.....	65
3.10. Brown-Brenn Analizi.....	65
3.11. İmmünohistokimyasal Analiz.....	66
3.12. TRAP Analizi.....	67
3.13. İstatistik Analiz.....	67
3.13.1. Radyografik Ölçümlerin İstatistik Analizi.....	67
3.13.2. Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal Verilerin İstatistik Analizi.....	67
4. BULGULAR.....	69
4.1. Radyografik Bulgular.....	69
4.2. Histopatolojik Bulgular.....	74
4.3. Histomorfometrik Bulgular.....	78
4.4. Brown-Brenn Boyama Bulguları.....	81
4.5. İmmünohistokimyasal Bulgular.....	83
4.5.1. IL-1 β	83
4.5.2. RANK.....	88
4.5.3. RANKL.....	92
4.5.4. OPG.....	96
4.5.5. TRAP.....	100
5. TARTIŞMA.....	104
5.1. Çalışmada Kullanılan Ajanın Seçimi.....	104
5.2. Çalışmada Kullanılan Yöntemlerin Seçimi.....	106
5.3. Radyografik Bulguların Değerlendirilmesi.....	109

5.4. Histopatolojik Bulguların Değerlendirilmesi	110
5.5. Histomorfometrik Bulguların Değerlendirilmesi	111
5.6. Brown-Brenn Boyama Bulgularının Değerlendirilmesi.....	112
5.7. IL-1 β için İmmünohistokimyasal Bulguların Değerlendirilmesi	114
5.8. RANK, RANKL ve OPG için İmmünohistokimyasal Bulguların Değerlendirilmesi	116
5.9. TRAP Bulgularının Değerlendirilmesi.....	119
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	121
ÖZET.....	124
KAYNAKLAR	126
EKLER.....	152
ÖZGEÇMİŞ.....	152
ETİK KURUL ONAYI	153
PROJE ONAYI	155

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

IL	: İnterlökin
TNF	: Tümör nekrotizan faktör
RANKL	: Reseptör aktivatör nükleer kappa B ligand
RANK	: Reseptör aktivatör nükleer kappa B
OPG	: Osteoprotegerin
LPS	: Lipopolisakkarit
LTA	: Lipoteikoik asit
PAMP	: Patojen ilişkili moleküler patern
PRR	: Patern tanımlama reseptörleri
TLR	: Toll like reseptör
CGRP	: Kalsitonin gen ilişkili peptid
SP	: P maddesi
IG	: İmmünglobulin
PG	: Prostaglandin
PMN	: Polimorfonükleer lökosit
NET	: Ekstrasellüler nötrofil tuzakları
MHC	: Temel doku uygunluğu bileşeni
TCR	: T hücresi antijen reseptörü
BCR	: B hücresi antijen reseptörü
T_H	: T helper hücresi
T_{reg}	: Düzenleyici T hücreleri
T_S	: Baskılayıcı T hücreleri
T_C	: Sitotoksik T hücreleri
RAG	: Rekombinasyon aktive edici gen

SCID	: Şiddetli kombine immün yetmezlik
IFN	: İnterferon
VIP	: vazoaktif intestinal peptid
NPY	: Nöropeptid Y
NGF	: Sinir büyüme faktörü
CBCT	: Konik ışınli bilgisayarlı tomografi
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
NK	: Doğal katil (hücreler)
ICAM	: Hücreler arası adezyon molekülü
VCAM	: Vasküler hücre adezyon molekülüleri
PECAM	: Platelet endotel hücresi adezyon molekül
LT	: Lökotrien
PAF	: Platelet aktive edici faktör
MMP	: Matriks metalloproteinaz
PDGF	: Platelet kaynaklı büyüme faktörü
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
TGF	: Dönüştürücü büyüme faktörü
IL-1Ra	: IL-1 reseptör antagonisti
APC	: Antijen sunan hücre
GM-CSF	: Granülosit/makrofaj koloni stimüle edici faktör
ERM	: Malessez epitel artıkları
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
KGF	: Keratinosit büyüme faktörü
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
SEM	: Taramalı elektron mikroskopu

TEM	: Geçirimli elektron mikroskobu
MMP	: Matriks metalloproteinaz
SCN	: Suprakiazmatik çekirdeğe
5HTP	: 5-hidroksitriptofan
NAT	: N-asetiltransferaz
HIOMT	: Hidroksiindol-o-metiltransferaz
NAS	: N-asetilserotonin
pg	: Pikogram
nm	: Nanometre
mg	: Miligram
LH	: Luteinize edici hormon
FDI	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
IUPHAR	: Uluslararası Temel ve Klinik Farmakoloji Birliği
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RNS	: Reaktif azot türleri
REM	: Hızlı-göz-hareketi
MTNR1A	: Melatonin reseptör tip 1A
CRP	: C-reaktif protein
BIC	: Kemik-implant bağlantısı
gr	: Gram
ml	: Mililitre
IP	: Periton içi, intraperitoneal
kg	: Kilogram
ISO	: Uluslararası standardizasyon kurumu
mm	: Milimetre

mm²	: Milimetrekare
µm	: Mikrometre, mikron
HE	: Hematoksilen-eozin
PDL	: Periodontal ligament
TRAP	: Tartarat dirençli asit fosfataz
PBS	: Fosfat tamponlu tuzlu suda
DAP	: 3,3'- diaminobenzidine
ANOVA	: Tekrarlanan ölçümlü varyans analizi
rank	: Sıra sayı ortalaması
BB	: Brown-Brenn boyama
RLX	: Raloksifen
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
ELISA	: İmmunosorbent deney
MCP	: Monosit kemotaktik protein
CCR	: Kemokin reseptör
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
PHOX	: Fagosit oksidaz
NF-κB	: Nükleer faktör kappa B
ODF	: Osteoklast farklılaşma faktörü
OPGL	: Osteoprotegerin ligand
TRANCE	: TNF ilişkili aktivasyon indükleyici sitokin
OCIF	: Osteoklastogenez inhibe edici faktör
ODN	: Odanacatib

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Ratların deney süresince ölçülen ağırlıkları ve ağırlıklara göre hesaplanan anestezi, etanol ve melatonin dozları.	46
Tablo 2. Deney grupları ve deney protokolü.	49
Tablo 3. Deney süreci.	52
Tablo 4. Enflamasyon skorları.	64
Tablo 5. Radyomikrografik incelemeler ile elde edilen pozitif kontrol ve melatonin grubuna ait periapikal lezyon alanı ortalama değerleri (mm^2) \pm standart hata.	69
Tablo 6. Periapikal bölgeden elde edilen ortalama piksel değerleri \pm standart hata. 73	
Tablo 7. Grupların histopatoloji ve Brown-Brenn boyama skorlarının ortalama \pm standart hata ve sıra sayı ortalama (rank) değerleri.	74
Tablo 8. Histomorfometrik analiz ile elde edilen gruplara ait periapikal lezyon alanı ortalama (mm^2) \pm standart hata ve sıra sayı ortalama (rank) değerleri.	78
Tablo 9. IL-1 β (+), RANK (+), RANKL (+) ve OPG (+) hücrelerin immunohistokimyasal boyanma yoğunluğu skorlarının ortalama \pm standart hata ve sıra sayı ortalama (rank) değerleri.	84
Tablo 10. Gruplara ait immunohistokimyasal TRAP (+) (osteoklast) hücre sayıları \pm standart hata.	100

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Osteoklast farklılaşması ve aktivasyonu	25
Resim 2. Kemik yıkımında RANK, RANKL ve OPG	27
Resim 3. Periton içi (IP) anestezi uygulaması.	47
Resim 4. Parmak sıkıştırma testi ile anestezi kontrolü.	48
Resim 5. Periapikal lezyon oluşumunun indüklenmesi amacı ile alt birinci büyükazı dişinin pulpasının ekspozite edilmesi.	50
Resim 6. Melatonin.....	54
Resim 7. Melatoninin hassas terazide tartılması.....	55
Resim 8. Mikropipet ile etanol ve distile su ölçümü.	56
Resim 9. Vorteks cihazı ile melatoninin etanol içerisinde çözündürülmesi.	57
Resim 10. IP melatonin veya etanol uygulaması.	58
Resim 11. Yumuşak dokular temizlenmiş rat sağ ve sol alt çeneleri.	60
Resim 12. Formaldehit içeren numaralandırılmış kaplara yerleştirilen alt çene örnekleri.	60
Resim 13. Standart radyografi alınabilmesi için hazırlanan düzenek.....	61
Resim 14. Periapikal lezyon boyutu ve piksel değerlerinin hesaplanması.	62
Resim 15. Otomatik doku takip cihazı	63
Resim 16. Fotoataçmanlı ışık mikroskobu ve görüntü analiz programı	64
Resim 17. Negatif kontrol grubundaki bir rata ait periapikal bölgenin radyomikrografik görünümü. Periapikal lezyon yok.	70
Resim 18. Pozitif kontrol grubundaki bir rata ait periapikal bölgenin radyomikrografik görünümü. Sınırları belirlenmiş periapikal lezyon alanı.....	71
Resim 19. Melatonin grubundaki bir rata ait periapikal bölgenin radyomikrografik görünümü. Sınırları belirlenmiş periapikal lezyon alanı.....	72
Resim 20. Negatif kontrol grubundaki bir rata ait periapikal bölgenin histopatolojik görünümü. Sağlıklı periodontal ligament, HE, Bar=200µm.	75
Resim 21. Pozitif kontrol grubundaki bir rata ait periapikal bölgenin histopatolojik görünümü. Yangısal hücre infiltrasyonları ile karakterize periapikal lezyon (oklar), PL (periodontal ligament), D (dentin), P (pulpa), HE, Bar=500µm..	76
Resim 22. Melatonin grubundaki bir rata ait periapikal bölgenin histopatolojik görünümü. Yangısal hücre infiltrasyonları ile karakterize periapikal lezyon (oklar), PL (periodontal ligament), D (dentin), P (pulpa), HE, Bar=500µm.	77
Resim 23. Pozitif kontrol grubundaki bir rata ait sınırları belirlenmiş periapikal lezyon alanı (1,1 mm ²). HE, Bar=500µm.	79

Resim 24. Melatonin grubundaki bir rata ait sınırları belirlenmiş periapikal lezyon alanı (0,8 mm ²). HE, Bar=500µm.	80
Resim 25. (A) Negatif kontrol grubundaki bir rata ait kron ve kök bölgesinden alınan bir kesit, bakteri boyanması yok, (B) Negatif kontrol grubundaki bir rata ait periapikal bölgeden alınan bir kesit, bakteri boyanması yok, Brown-Brenn Boyama (BB), Bar=200µm.	82
Resim 26. (A) Pozitif kontrol grubundaki bir rata ait kron ve kök bölgesinden alınan bir kesit, yoğun bakteri boyanması (oklar), (B) Pozitif kontrol grubundaki bir rata ait periapikal bölgeden alınan bir kesit, bakteri kümeleri (oklar), BB, Barlar=100µm.	82
Resim 27. (A) Melatonin grubundaki bir rata ait kökün orta üçlüsünden alınan bir kesit, bakteri boyanması (oklar), (B) Melatonin grubundaki bir rata ait periapikal bölgeden alınan bir kesit, nötrofiller içerisinde fagosite edilmiş az sayıda bakteri (oklar), BB, Barlar=100µm.	83
Resim 28. Negatif kontrol grubundaki bir rata ait periapikal bölgede IL-1β ile immunohistokimyasal boyama, az sayıda hücrede pozitif immünreaksiyon (oklar), Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=200µm.	85
Resim 29. Pozitif kontrol grubundaki bir rata ait periapikal bölgede IL-1β ile immunohistokimyasal boyama, çok sayıda hücrede pozitif immünreaksiyon (oklar), Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=200µm.	86
Resim 30. Melatonin grubundaki bir rata ait periapikal bölgede IL-1β ile immunohistokimyasal boyama, az sayıda hücrede pozitif immünreaksiyon (oklar), Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=200µm.	87
Resim 31. Negatif kontrol grubundaki bir rata ait periapikal bölgede RANK ile immunohistokimyasal boyama, az sayıda hücrede pozitif immünreaksiyon (oklar), Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=200µm.	89
Resim 32. Pozitif kontrol grubundaki bir rata ait periapikal bölgede RANK ile immunohistokimyasal boyama, çok sayıda hücrede pozitif immünreaksiyon (oklar), Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=200µm.	90
Resim 33. Melatonin grubundaki bir rata ait periapikal bölgede RANK ile immunohistokimyasal boyama, az sayıda hücrede pozitif immünreaksiyon (oklar), Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=200µm.	91
Resim 34. Negatif kontrol grubundaki bir rata ait periapikal bölgede RANKL ile immunohistokimyasal boyama, az sayıda hücrede pozitif immünreaksiyon (oklar), Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=200µm.	93
Resim 35. Pozitif kontrol grubundaki bir rata ait periapikal bölgede RANKL ile immunohistokimyasal boyama, çok sayıda hücrede pozitif immünreaksiyon (oklar), Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=200µm.	94
Resim 36. Melatonin grubundaki bir rata ait periapikal bölgede RANKL ile immunohistokimyasal boyama, az sayıda hücrede pozitif immünreaksiyon (oklar), Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=200µm.	95

- Resim 37.** Negatif kontrol grubundaki bir rata ait periapikal bölgede OPG ile immunohistokimyasal boyama, az sayıda hücrede pozitif immünreaksiyon (oklar), Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=200µm. 97
- Resim 38.** Pozitif kontrol grubundaki bir rata ait periapikal bölgede OPG ile immunohistokimyasal boyama, çok sayıda hücrede pozitif immünreaksiyon (oklar), Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=200µm. 98
- Resim 39.** Melatonin grubundaki bir rata ait periapikal bölgede OPG ile immunohistokimyasal boyama, çok sayıda hücrede pozitif immünreaksiyon (oklar), Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=200µm. 99
- Resim 40.** Negatif kontrol grubundaki bir rata ait periapikal bölgede TRAP ile immunohistokimyasal boyama, pozitif immünreaksiyon gösteren hücre (osteoklast) yok, Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=50µm. 101
- Resim 41.** Pozitif kontrol grubundaki bir rata ait periapikal bölgede TRAP ile immunohistokimyasal boyama, çok sayıda hücrede pozitif immünreaksiyon (osteoklastlar=oklar), Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=50µm. 102
- Resim 42.** Melatonin grubundaki bir rata ait periapikal bölgede TRAP ile immunohistokimyasal boyama, az sayıda hücrede pozitif immünreaksiyon (osteoklastlar=oklar), Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=50µm. 103

1. GİRİŞ

Apikal periodontitis endodontik kaynaklı etiyolojik ajanların sebep olduğu periradiküler dokuların enflamasyonu ve yıkımıdır (1).

Periapikal dokulardaki patolojik değişiklikler mikroorganizmanın kendisinden, toksinlerinden, zararlı metabolik artıklarından ve kök kanal sistemi içerisinde kalan pulpa dokusundan kaynaklanmaktadır (2,3).

Pulpada enflamasyon yayıldıkça, enflamatuar medyatörler, periapikal dokuların fizyolojisini değiştirmeye başlamaktadır. Kemik rezorpsiyonuna bağlı periodontal ligament aralığında genişleme veya periapikal lezyon oluşumu radyografik olarak gözlenebilmektedir.

Kemik yıkımı esas olarak osteoklastların aktivasyonu ile gerçekleşmektedir. İnterlökin (IL)-1, IL-11, IL-17 ve tümör nekrotizan faktör (TNF)- α gibi birçok sitokin osteoklast farklılaşması ve aktivasyonu üzerinde etkilerinin olduğu bilinmektedir (4). Reseptör aktivatör nükleer kappa B ligand (RANKL) (5,6), reseptör aktivatör nükleer kappa B (RANK) (7) ve osteoprotegerin (OPG)'nin (8,9) keşfedilmesi osteoklastların farklılaşması ve işlevlerinin nasıl düzenlendiğini ortaya çıkarmıştır. Apikal periodontitis lezyonlarına yoğun enflamatuar infiltrasyon ve sayıca artmış osteoklastlar hakimdir (1).

Enflamatuar medyatörler ile osteoklast farklılaşmasını ve aktivasyonunu baskılayabilecek bir ajanın kullanılmasının periapikal dokularda meydana gelebilecek yıkımı azaltabileceği düşünülmektedir.

Melatonin epifiz bezinden ve diğer organlardan sentez edilir ve salgılanır. Melatoninin güçlü antioksidan etkileri (10-12), bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde rolleri (13,14), kansere karşı koruyucu etkileri (15,16), yaşlanmayı geciktirici özellikleri (17) bulunmaktadır. Mikromolar konsantrasyonlarda, insan osteoblastlarından tip 1 kollagen sentezini uyarmakta, osteoblast farklılaşmasını ve kemik yapımını teşvik etmektedir (18,19). Enflamasyon sırasında, serbest oksijen radikalleri kemik rezorpsiyonunda önemli rol oynamaktadır. Uyarılmış monositler, makrofajlar ve nötrofiller serbest oksijen radikallerini üretirler. Osteoklastların uyarılmasından veya direkt olarak matriksin çözünmesinden, ortamdaki serbest

radikaller sorumlu olabilir. Melatonin dolaylı antioksidan etkisi ve direkt serbest radikal temizleme etkisi yoluyla osteoklastların etkinliğini geciktirmektedir ve böylece kemik yıkımını azaltmaktadır (20,21).

Diş hekimliğinde az sayıda çalışmada melatoninin, fizyolojik diş gelişiminde, çürük oluşumunda, oral kanserlerde, prekanseröz lezyonlarda, periodontal hastalıklardaki kemik yıkımında, diş çekimi nedeniyle oluşan ve cerrahi sonrası yaralarda kemik iyileşmesinde, kemik içi dental implantların çevresinde kemik yapımında, pulpada meydana gelen hasarın ve nekrozun azaltılmasında rolü olduğu gösterilmiştir. Literatürde endodontik periapikal lezyonlarda melatoninin etkisini araştıran herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmanın amacı; melatoninin ratlarda sistemik uygulamasının deneysel periapikal lezyon oluşumu üzerine olası etkilerinin araştırılmasıdır. Bu amaçla;

- periapikal bölgedeki kemik yıkımı boyutu histomorfometrik ve radyografik olarak,
- enflamasyon şiddeti histopatolojik olarak,
- mikroorganizmaların kök kanalı boyunca penetrasyonu Brown-Brenn boyama ile,
- kemik yıkımı esnasında salınan IL-1 β düzeyleri immunohistokimyasal analiz ile,
- osteoklast farklılaşması, aktivasyonu ve yaşamı için anahtar düzenleyiciler RANK, RANKL, OPG yoğunluğu immunohistokimyasal analiz ile,
- periapikal alandaki osteoklast sayısı immünohistokimyasal TRAP boyama yöntemleri ile değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Apikal Periodontitis

Apikal periodontitis endodontik kaynaklı etiyolojik ajanların sebep olduğu periradiküler dokuların enflamasyonu ve yıkımıdır. Genellikle endodontik enfeksiyonun sekeli olarak görülmektedir (1). Bakteri ve yan ürünlerinin pulpa dokusuna invazyonu enflamatuvar bir reaksiyon başlatmaktadır. Bu reaksiyon kontrol altına alınamazsa periapikal dokularda kronik enfeksiyona yol açmaktadır (22).

Apikal periodontitis enfekte kök kanalındaki bakteriyel enfeksiyondan kaynaklanan en sık görülen dental enflamatuvar kemik yıkımı hastalığıdır (23). Apikal periodontitis ile ilgili yapılmış epidemiyolojik çalışmalarda yaşları 20 ile 30 arasında değişen hastalarda, görülme sıklığı %33, yaşları 30 ile 40 arasında değişen hastalarda %40, yaşları 40-50 arasında değişen hastalarda %48, yaşları 50-60 arasında değişen hastalarda %57 ve 60 yaş üzerindeki hastalarda %62 olarak belirlenmiştir (24).

Periradiküler dokuların çeşitli yaralanmalara karşı verdiği yanıt, vücudun herhangi bir yerindeki bağ dokusu cevabına benzemektedir. Bu yanıt, immünoinflamatuvar reaksiyon şeklinde ortaya çıkmaktadır. Apikal periodontitisin ana etkeni kök kanal pulpasının mikrobiyal enfeksiyonu olsa da (2,3) periapikal dokulardaki patolojik değişimlere bakterilerden ziyade kendi toksinleri, zehirli metabolik ürünler ve pulpa dokusunun parçalanması yol açmaktadır. Bu iritanlar, doğal ve kazanılmış bağışıklık yanıtının uyarılmasından sorumludur. İmmünoinflamatuvar yanıtta başlıca endotel hücreleri, mast hücreleri, trombositler, fibroblastlar, nötrofiller, makrofajlar, dentritik hücreler, immunglobulinler, enflamatuvar medyatörler, proenflamatuvar sitokinler, kemokinler ve nöropeptidler rol almaktadır.

Kök kanal sistemine yerleşmiş bakteri ve bakteri ürünleri etkin bir şekilde uzaklaştırıldığında ve kök kanal sistemi ortograt ve retrograt olarak sızdırmaz bir şekilde doldurulduğunda, periradiküler dokular tamir ve rejenerasyon ile orijinal haline dönebilmektedir. Fakat inatçı mikrobiyal filmler sebebiyle tedaviden sonra iyileşmeyen apikal periodontitis vakaları da görülebilmektedir (25).

2.1.1. Etiyoloji

Apikal periodontitis, eksojen ve endojen kaynaklı olabilir. Bakteriler ve toksinleri, toksik metabolik ürünler, kimyasal ajanlar, mekanik irritasyon, yabancı cisim ve travma eksojen faktörlerdendir. Endojen faktörler arasında ise ürat, kolesterol kristalleri, sitokinler veya osteoklastları aktive eden enflamatuvar medyatörler gibi konağın metabolik ürünleri bulunmaktadır. Bu irritanlar, antijenik veya antijenik olmayan yolları aktive ederek doğal ve kazanılmış immünoenflamatuvar yanıtları başlatabilmektedir (26).

Apikal periodontitisin ana etkeni, kök kanal sistemindeki pulpa dokusunun çürük ya da diğer yollar ile oluşan enfeksiyonudur (2,3,27). Nekrotik pulpada çeşitli tiplerde bakteri varlığı ilk olarak 1890 yılında Miller tarafından gösterilmiştir (28). Kakehashi ve ark, germ-free ratlarda ağız ortamına açık bırakılan azı dişlerde pulpa nekrozu ve periradiküler enflamasyon gelişmediğini rapor etmişlerdir. Bu çalışmada kontrol grubundaki klasik oral mikrofloraya sahip ratlarda ise pulpa nekrozu ve periadiküler enflamasyon meydana gelmiştir (2). İnsanlarda da benzer cevap görülmektedir. Kültür yöntemleri kullanılarak yapılan çalışmalarda bakteriyel kontaminasyon olmayan, kronu sağlam ve nekrotik pulpalı travma geçirmiş dişlerde periapikal kemik yıkımının olmadığı radyografik olarak gösterilmiştir. Buna karşın bakterilerin izole edildiği, kronu sağlam ve nekrotik pulpalı dişlerde radyografik olarak periradiküler kemik yıkımı gözlenmektedir (27). Bu önemli bulgu maymun deneylerinde de gösterilmiştir. Sağlam vital dişlerin pulpaları aseptik koşullarda devitalize edilip kök kanalları 6 aydan 1 yıla kadar bakteri geçirmeyecek şekilde restore edildiğinde periradiküler enflamasyon görülmediği rapor edilmiştir (3,29). Bu bulgular birlikte ele alındığında apikal periodontitisin gelişiminde esas etyolojik faktörün bakteriler olduğu kanıtlanmaktadır.

Bakteriyel toksinler örneğin lipopolisakkarit (LPS), lipoteikoik asit (LTA) ve kök kanal sisteminden periapikal dokulara salınan zararlı metabolik ürünler periapikal immüno enflamatuvar reaksiyonu başlatabilmektedir. Örneğin LPS duysal sinir fibrillerinden vazodilatasyona yol açan ve vazküler geçirgenliği arttıran kalsitonin gen ilişkili peptid (CGRP) ve P maddesi (SP) salınımını uyurabilmektedir (30,31).

Apikal periodontitis bakteriyel toksinlerin, enzimlerin ve zehirli metabolik ürünlerin veya direkt olarak kök kanalındaki bakterilerin periapikal dokulara girişi ile oluşabilmektedir. Apikal enfeksiyon ile apikal enflamasyon arasındaki ayrımın doğru yapılması önemlidir. Apikal enflamasyon, vazodilatasyon, damar geçirgenliğindeki artış ve eksuda oluşumuna yol açan kök kanalından gelen iritanlara karşı periapikal dokuların gösterdiği reaksiyondur. Apikal enfeksiyon ise, patojenik mikroorganizmaların fiziksel varlığına bağlı olarak periapikal dokularda hasar oluşturmaktadır. İmmün sistemi baskılanmış hastalarda enflamasyon olmadan enfeksiyon gelişebilmektedir. Çeşitli enfarktüslerde, fiziksel veya kimyasal yaralanma durumlarında ise enfeksiyon olmadan enflamasyon oluşabilmektedir (32). Apikal periodontitis esas olarak enfeksiyöz bir hastalık olmasına rağmen apse oluşumu (33-35), fistül (24,36,37) veya ekstraradiküler endodontik enfeksiyon (38,39) dışındaki vakalarda bakteriler periapikal dokularda(40-42) bulunmamaktadır.

Periapikal enfeksiyon bu bölgedeki mikroorganizmaların virülansı, sayısı ve kombinasyonu ile ilişkilidir (43). Kök kanal sistemindeki enfeksiyon odağı mekanik enstrümantasyon, antiseptik irrigasyon ve kanal içi medikasyon ile ortadan kaldırıldıktan sonra bakteriler konak savunma mekanizmaları tarafından yok edilene kadar enflame periradiküler dokular içerisinde geçici olarak bulunabilmektedir. Bu nedenle apse oluşumu görülen ya da fistül yolu oluşan apikal periodontitis lezyonlarının çoğunda sistemik antimikrobiyal tedaviye ihtiyaç duyulmadan cerrahi olmayan kök kanal tedavisi sonrasında yeterli derecede iyileşme görülmektedir (24).

Tedavi edilmemiş kök kanallarındaki primer enfeksiyon anaeroplara baskın olduğu eşit miktarlarda gram pozitif ve gram negatif türlerden oluşmaktadır (43,44). Tedavi edilmiş apikal periodontitisli dişlerde fakültatif ve anaerobik türlerin eşit dağıldığı gram pozitif mikroorganizmaların diğer mikroorganizmaları baskıladığı görülmektedir (45,46). İnatçı apikal periodontitis ile ilişkili kök kanal tedavisi yapılmış dişlerde *E. faecalis* türü yüksek oranda görülmektedir (45-50).

Yaralanmanın ciddiyetine ve kimyasalların sitotoksitesine bağlı olarak periapikal dokulardaki fiziksel (taşkın çalışma, taşkın dolum), kimyasal (irriganlar, kanal içi medikasyon ve kök kanal dolgu maddeleri) (51) ve travmatik yaralanmalar (52) da apikal periodontitise yol açabilmektedir. Kök kanal dolgu

materyali gibi yabancı cisimlerin inatçı periapikal enflamasyona yol açtığı gösterilmiştir (53,54). Genel olarak kök kanal dolgu materyalleri biyouyumludur ve periapikal dokular tarafından iyi şekilde tolere edilir fakat yabancı cisimler bakteriler için taşıyıcı görevi yapabilmektedir (53).

2.1.2. Enfeksiyon: Mikroorganizma ve Konak Doku Arasındaki Denge

Enfeksiyon; mikroorganizmaların çoğalma, yayılma ve hastalığa sebep olma özellikleri ile konağın kontrol yeteneği, mikroorganizmaları ve oluşan enfeksiyonu yok edebilme yeteneği arasındaki yarıştır (55). Konak doku pulpa enfeksiyonu ve periapikal enfeksiyondan korunmak için mine, dentin ve yüzey epiteli gibi fiziksel bariyerler ile doğal ve kazanılmış bağışıklık sistemine sahiptir. Bunun yanında mikroorganizmalar da fagosit inhibisyonu, lizozomal fonksiyon inhibisyonu, kompleman sistemi ve immünglobulinlerin (IG) inaktivasyonu ve özel mekanizmalar ile konağın fiziksel bariyerlerinden geçmelerini sağlayan silahlara sahiptir (55).

2.1.3. Patogenez

Pulpa enflamasyonu veya enfeksiyonlarında; doğal ve kazanılmış bağışıklık hücreleri, sitokin, kemokin ve nöropeptid gibi yüksek miktarlarda enflamatuar medyatörler salgılamaktadır. Pulpa enflamasyonu ilerledikçe, enflamatuar medyatörler, periapikal dokuların fizyolojisinde değişikliklere sebep olmaktadır. Radyografik olarak, kemik rezorbsiyonuna bağlı periodontal ligament aralığında genişleme veya apikal osteolitik lezyonun gelişimi gözlenebilir değişimlerdendir. Kemik kaybı esas olarak, osteoklastların aktivasyonu ile gerçekleşmektedir. İnterlökin (IL)-1, IL-11, IL-17 ve tümör nekrotizan faktör (TNF)- α gibi birçok sitokin osteoklast farklılaşması ve aktivasyonu üzerinde etkilerinin olduğu bilinmektedir (4). Periapikal dokulardaki enflamasyona bağlı kemik rezorbsiyonu kök kanalındaki mikrobiyal invazyonun yayılmasını engelleyen bir savunma hattı oluşturan bağışıklık sistemi hücrelerinin toplanmasına yol açmaktadır (23). Apikal periodontitisin patogenezini doğal ve kazanılmış bağışıklık yanıtlarının yanında periapikal dokulardaki duysal sinir cevabını da içermektedir.

2.1.3.1. Doğal Bağışıklık Yanıtı

2.1.3.1.1. Özgün Doğal Bağışıklık Yanıtı

Konak dokunun enfeksiyonlarla mücadelesinde doğal bağışıklık, kazanılmış bağışıklık ile kıyaslandığında patojenleri tanıyan reseptörler açısından çok daha kısıtlıdır. Doğal bağışıklık sistemi patojenlerde ortak olan bir dizi moleküler yapıyı tanıyabilmekte ve böylece konağa ait olup olmadığını belirleyerek savunmayı başlatabilmektedir. Patojenler üzerindeki bu yapılara mikroorganizmaya özgül moleküller “patojen ilişkili moleküler patern (PAMP)” denilmektedir. Doğal bağışıklık sistem hücreleri üzerinde mikrobiyal patojenler veya hücrel stresle ilgili molekülleri tanıyan proteinlere “patern tanımlama reseptörleri (PRR)” denir. Bu reseptörler, hücre içi, salgılanan ve sinyal ileten olmak üzere 3 gruba ayrılmaktadır. Sinyal ileten reseptör grubunu “toll like reseptör (TLR)” ailesi oluşturmaktadır. TLR’ler mikrobiyal ajanlar tarafından üretilen PAMP’leri tanımaktadır (56).

TLR’lerin aktivasyonu, opsonizasyon ve kompleman aktivasyonu, fagositoz, proenflamatuar sinyal yollarının aktivasyonu ve apoptozun indüklenmesi gibi birçok konak yanıtını tetiklemektedir (57). Örneğin, TLR4/CD14 gram (-) bakterilerin LPS’leri için bir reseptördür. TLR4 eksikliği olan farelerin diş pulpalari açık bırakıldığında ve dört anaerobik patojen karışımı (*prevotella intermedia*, *fusobacterium nucleatum*, *streptococcus intermedius* ve *peptostreptococcus micros*) ile enfekte edildiğinde, IL-1 ve IL-12 ekspresyonu ve kemik yıkımı azalmaktadır (58). Ayrıca LPS, nosiseptif duyu nöronlarının üzerinde açığa çıkarılan TLR4/CD14’ün direkt aktivasyonu yoluyla ağrı oluşturabilmektedir (59). Bu nedenle, TLR4 PRR reseptörleri odontojenik enfeksiyonlarda önemli bir role sahiptir.

Gram (+) hücre duvarının LTA gibi bileşenleri LPS’ye benzer yollarla doğal bağışıklığı uyarabilmektedir. TLR2, gram pozitif bakterilerin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır ve LTA, lipoproteinler ve peptidoglikanlar gibi çeşitli mikrobiyal yapıların tanınmasında yer almaktadır. Konak savunmasında TLR2’nin önemi *staphylococcus aureus* veya *streptococcus pneumoniae* türlerine duyarlı bulunan TLR2 eksikliği olan fareler kullanılarak gösterilmiştir (60,61). LTA, lökositleri

stimüle ederek ve enflamatuar yanıtın çeşitli fazlarında önemli rol oynayan prostoglandin (PG) E2, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 gibi enflamatuar medyatörlerin salınmasını uyarmaktadır. Tüm bu enflamatuar medyatörler, periapikal dokularda tanımlanmıştır ve çeşitli konak yanıtlarını aktive ederek doku hasarına yol açmaktadır.

2.1.3.1.2. Özgün Olmayan Doğal Bağışıklık Yanıtı

Apikal periodontitis enfeksiyonlarında doğal bağışıklık savunma mekanizması polimorfonükleer lökositler (PMN) ve makrofajlar gibi özelleşmiş fagositler tarafından yapılan bakteri fagositozsidir. Doku enflamasyonu, PMN'lerin damar dışına çıkarak dokuda toplanmasına sebep olmaktadır. Aktive olmuş PMN'lerde solunum patlaması olarak bilinen, yakınındaki mikroorganizmalar ve konak hücrelerine hasar veren kısa ömürlü oksijen radikallerinin salınımı ile sonuçlanan, oksijen tüketiminde ani bir artış görülmektedir. (62). Fagosite edilmiş bakteriler veya yabancı cisimler, özel ve azürofil granülleri ile oksijen türevi serbest radikallerin olduğu toksik bir ortama maruz bırakılmaktadır ve sonunda parçalanmaktadır (63). Ayrıca PMN'ler ekstrasellüler nötrofil tuzakları (NET) aracılığıyla hücre dışı bir öldürme mekanizmasına da sahiptir. NET'ler nötrofilik granüllerdeki özel proteinlerle birlikte kromatin ipliklerden oluşan ekstrasellüler yapılardır. Aktivasyondan sonra nötrofiller apoptozis adı verilen kendi ölümlerine ve antimikrobiyal aktiviteleri olan NET'lerin oluşmasına yol açan hücrel bir programı başlatmaktadır (64,65). Doğal bağışıklıktaki rollerinin yanında, fagositler ve makrofajlar, T-helper lenfositlerin antijen-spesifik kolonileri ile etkileşen temel doku uygunluğu bileşeni (MHC) sınıf II moleküllerini açığa çıkararak antijen sunan hücre görevi yapmaktadır. Dolaşımdaki monositler, hem doku makrofajlarının hem de çoğu dendritik hücre alt gruplarının öncülleridir (66,67).

2.1.3.2. Kazanılmış Özgün Bağışıklık Yanıtı

Kazanılmış bağışıklık B ve T lenfositlerde, vücut antijenleri veya yabancı antijenleri tanımlayan ve bağlayan moleküllerin üretilmesi ile sonuçlanan genetik seviyede düzenlenen karmaşık bir işlemdir. Bu moleküller; T hücresi antijen reseptörü

(TCR) ve B hücresi antijen reseptörü (BCR, immunoglobulin olarak da tanımlanmaktadır) olarak tanımlanan özel reseptörlerdir. BCR'ler antijenlerle direkt olarak etkileşirken, TCR'ler diğer yardımcı moleküller ile birlikte MHC molekülleri tarafından sunulan antijenler ile etkileşime girmektedir. BCR'ler dolaşım içine ya da doku içine antikor olarak salgılanabilmektedir.

TCR ile antijen, peptid/MHC kompleksi ve yardımcı uyarılar arasındaki etkileşim T hücrelerini aktive ederek; T hücresi büyüme faktörü, IL-2 ve T hücrelerinin klonal genişlemesini/proliferasyonunu sağlayan reseptörlerin sentezine yol açmaktadır. T hücrelerinin bazıları farklılaşarak, efektör T veya hafıza hücrelerine dönüşmektedir. T hücreleri fonksiyonlarına göre farklı alt sınıflara ayrılmaktadır; yardımcı T hücreleri (T helper: T_H), düzenleyici T hücreleri (T regulator hücreler: T_{reg}), baskılayıcı T hücreleri (T süpresör hücreler: T_S) ve sitotoksik T hücreleri (T cytotoxic (sitolitik): T_C) (66,68,69).

Lenfosit eksikliği olan kemirgenlerin kullanıldığı çalışmalarda, apikal periodontitis lezyonlarında erken dönemde (2 hafta) kemik kaybının hızlandığı, fakat lezyon gelişiminin tüm safhalarının etkilenmediği gösterilmiştir (70,71). Rekombinasyon aktive edici gen (RAG)-2 şiddetli kombine immün yetmezlik (SCID) fareleri (T ve B hücre eksikliği olan) kullanıldığında, RAG-2 farelerinin yaklaşık üçte birinde endodontik apse oluşumu gözlenirken, bağışıklık sistemi normal olan kontrol grubunda apse oluşumu gözlenmemiştir (72). RAG-2 eksikliği olan fareler ile yapılan başka bir çalışmada, B hücrelerinin endodontik enfeksiyonun yayılmasının önlenmesinde önemli rol oynadığı, T hücrelerinin ise önemli rolü olmadığı gösterilmiştir (73). Sonuç olarak, hem T hem de B hücreleri apikal periodontitis lezyonlarında gözlenen bağışıklık cevaplarına aracılık etmektedir (23).

2.1.3.3. Nörojenik Enflamasyon

Bazı primer afferent sinir lifleri çeşitli iritanlar sebebiyle damarların genişlemesi, damar dışına protein çıkışı ile makrofaj, nötrofil, mast hücreleri ve lenfositler gibi bağışıklık sistemi hücrelerinin toplanması/düzenlenmesi gibi olaylara yol açan nöropeptidler salgılamaktadır. Bu olay nörojenik enflamasyon olarak isimlendirilmektedir. Nörojenik enflamasyondaki öncül nöropeptidlerden CGRP

vazodilatasyondan, SP ise damar dışına protein çıkışından sorumludur. Nöropeptidler ve reseptörleri vücut genelinde dağılmıştır. Enflamasyon süresince, afferent liflerde flizlenme (74) ve nörojenik enflamasyona yol açan nöropeptid salgılanmasını tetikleyen enflamatuar medyatörlerde yerel artış görülmektedir (75,76). Kronik apikal periodontitis lezyonlarının gelişiminde nöropeptidler bağışıklığın düzenlenmesi, kemik rezorpsiyonu ve yara iyileşmesinde görev almaktadır. Yeterli yoğunluklardaki SP makrofajlardan IL-1, TNF- α ve IL-6 salgılanmasını arttırmaktadır, T lenfosit proliferasyonunu uyarmaktadır ve T hücreleri yoluyla antijen uyarımlı interferon (IFN)- γ üretimini arttırmaktadır (77). SP gibi nöropeptidler enflamatuar ve bağışıklık cevabını yükseltirken, vasoaktif intestinal peptid (VIP) ve nöropeptid Y (NPY) gibi nöropeptidler enflamatuar cevapları baskılamaktadır (78).

Kronik apikal periodontitis lezyonlarında makrofaj ve lenfosit gibi hücrelerden SP ve CGRP için özel reseptörler açığa çıkmaktadır. Hem CGRP hem de VIP osteoklast fonksiyonlarını baskılayarak kemik rezorpsiyonun azaltılmasında rol oynamaktadır. Apikal periodontitis lezyonlarında VIP seviyesi lezyonun büyüklüğü ile ters orantılıdır. VIP'nin makrofajlar üzerine etki göstererek TNF- α , IL-6 ve IL-12 üretimini engellemesi, apikal periodontitis lezyonlarının gelişmesinin kontrolünde rol oynayabileceğini düşündürmektedir (75).

2.1.4. Apikal Periodontitis Tanısı

2.1.4.1. Klinik ve Histolojik Bulgular Arasındaki İlişki

Enflamatuar periapikal hastalıkların tanısı klinik işaretler ve/veya semptomlar, hastalığın süreci, pulpa testleri, perküsyon, palpasyon ve radyografik bulgular ile konmaktadır. Histolojik tanı ise hastalıklı dokuların hücrelerinin ve ekstrasellüler matriksinin biyolojik ve morfolojik olarak tanımlanmasıdır. Klinik tanı, işaretlere, belirtilere ve test sonuçlarına bakılarak ön tanı sunarken, doku hastalıklarının kesin tanısı histolojik tanıdır.

Apikal periodontitis, pulpa enflamasyonu ve enfeksiyonu gibi (51) her zaman semptomatik veya ağrılı olmamaktadır. Nosisseptif duyu sinir liflerinin

uyarılmasında ve duyarlı hale gelmesinde nöropeptidler (SP, CGRP) gibi birçok enflamatuar medyatör (histamin, bradikinin, PG) ve proenflamatuar sitokin (IL-1, IL-6, TNF- α , sinir büyüme faktörü: NGF) sorumludur (74,79). Endojen opioidler ve somastatin ise enflamasyon sırasında enflamatuar hücrelerden salınarak duyu sinir liflerini inhibe etme yeteneğine sahiptir (80). Nosiseptif duyu sinir liflerinin uyarılması enflamatuar medyatörlerin konsantrasyonları ile ilişkilendirilebilir. Bu bulguların karmaşıklığı, apikal periodontitisin klinik semptomları ile histopatolojik bulguları arasında güçlü bir korelasyon bulunmadığını desteklemektedir (81-83).

2.1.4.2. Radyografik ve Histolojik Bulgular Arasındaki Korelasyon

Radyografi, hücresel seviyede olmayan patolojik doku değişikliklerini tespit edebilmek için tasarlanmıştır. Ultrason, konik ışınli bilgisayarlı tomografi (CBCT) ve diğer teknolojiler gibi hassas görüntüleme sistemleriyle bile periapikal dokulardaki enflamatuar hücrelerin varlığı veya diğer değişiklikler belirlenmemektedir. Geleneksel radyografik ve histolojik yöntemler kullanılarak kadavralar üzerinde yapılan çalışmalarda radyografik olarak sağlıklı bulunan endodontik tedavi görmüş dişlerde enflamasyon bulgusu gözlemlendiği rapor edilmektedir (84-86). Bu bulgu, lezyonun süngerimsi kemikte sınırlı kaldığı durumlarda radyografik olarak görüntü vermemesi, sadece kortikal kemiğe ulaştığında görülebilir olması ile desteklenmektedir (87-89). Radyografik bulgular, kist ve granülomların ayırt edilmesine olanak sağlamamaktadır (90,91). Bu nedenle vaka serisi çalışmaları temel alındığında apikal periodontitisin radyografik bulguları ile histolojik özellikleri arasında zayıf bir korelasyon bulunduğu söylenebilir (26).

Endodontik olarak klinik belirtilerin yokluğu ve/veya negatif periapikal radyografik bulgular apikal periodontitis olmadığı anlamına gelmemektedir. Bununla birlikte; cerrahi olmayan endodontik tedavi uygulanan dişlerde işaret ve belirtilerin yokluğu ve negatif radyografik bulgular, peripikal lezyonlarda histolojik iyileşmenin tamamlandığını da göstermemektedir. Günümüzde endodontide kullanılan perküsyon, palpasyon ve vitalite testleri enflamatuar periapikal hastalıkların histolojik tanısında yeteri kadar hassas değildir. Aslında tüm endodontik testler nosiseptif duyu liflerinin fonksiyonlarını incelemek için kullanılmaktadır fakat pulpa ve/veya periapikal dokuların patolojik değişiklikleri hakkında bilgi vermemektedir.

2.1.5. Histopatoloji

Günümüzde histopatoloji, hastalıklı doku ve organların hüresel ve moleküler biyolojisine odaklanmıştır. Hücre yaranlamasında, ışık ve elektron mikroskobu düzeyinde gözlemlenebilen morfolojik değişikliklerinden önce hücre içinde biyokimyasal bozukluklar meydana gelmektedir.

Etiyoloji, klinik işaretler, belirtiler ve hastalığın süresi esas alınarak, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) periapikal doku hastalıklarını farklı kategorilerde sınıflandırmaktadır (92). Klinik belirtiler ve histolojik görüntülere bağlı olarak Amerikan Endodontistler Heyeti' ne göre ve çeşitli endodontik ders kitaplarında (24,93,94) enflamatuar periradiküler hastalıkların birçok sınıflandırması bulunmaktadır. Ayrıca Amerikan Endodontistler Birliği 2008 sonbaharında tanı terimleri üzerine bir uzlaşma konferansı düzenlemiştir. Kanıt değeri yüksek çalışmaların yetersizliği sebebiyle, endodontik camiada pulpal ve periapikal hastalıkların terminolojisi üzerine geleneksel olarak fikir birliği bulunmamaktadır.

Apikal periodontitisin histopatolojik sınıflandırılması periapikal dokulardaki immünoenflamatuar cevaplarda rol oynayan hücre tipleri esas alınarak yapılmaktadır. Genelde, enflamasyon zarar gören dokudaki hücrelerin tiplerine bağlı olarak akut ve kronik cevaplar diye ikiye ayrılmaktadır (32,95,96).

Akut immünoenflamatuar cevap nötrofil lökositlerin, kronik immünoenflamatuar cevap ise makrofaj ve lenfositlerin varlığı ile nitelendirilmektedir. Bununla birlikte, doku hasarının şiddeti, etiyoloji, konak direnci ve özel dokuların varlığı gibi birçok değişken akut ve kronik immünoenflamatuar cevaptaki hücre biyolojisini etkilediği gibi hastalık seyrini ve morfolojik farklılıkları da etkileyebilmektedir (32,95).

2.1.6. Semptomatik Apikal Periodontitis

Apikal periodontitisin total pulpa nekrozunu takip ettiği genel bir kanıdır. Bu düşünce pulpanın düğümlenmesi-boğumlanması teorisine dayandırılır. Bu teoriye göre enflamasyon sırasında pulpal doku içi basıncı artar ve bu durum toplardamarların daralmasına ve kan akışının kesilmesine sebep olmaktadır (74). Bu

düşüncenin dayandırıldığı diğer bir teori ise hayvan ve insan çalışmalarında bilinçli olarak devital hale getirilen ya da kontamine olmadan travmatik nedenlerle nekrotik hale gelen pulpada periapikal enflamasyonun olmamasıdır (3,27,29). Bununla birlikte, vital pulpa çürük veya diğer yollarla enfekte olduğunda, periapikal enflamasyon gelişebilir ancak kök kanalının apikal parçasında hala vital doku bulunabilir. Şu ana kadar elde edilen apikal periodontitis histopatolojisi ile ilgili bilgilerin çoğunluğu hayvanlarda yapay kök kanal enfeksiyonu ile oluşturulan apikal periodontitis çalışmalarından veya insanlarda çürüğe bağlı uzun süren, kronik lezyonlardan elde edilmiştir. Bu şartlarda, pulpitisten apikal periodontitise geçiş yakalanamamaktadır. Kovacevic ve ark, (2008) köpeklerde pulpa nekrozundan apikal periodontitise geçişi araştırdıkları çalışmada pulpitis ve akut apikal periodontitisin birlikte seyrettiğini gözlemlemişlerdir (97). Benzer olarak, Kimberly ve Byers hayvanlarda periapikal değişikliklerin pulpa ekspozundan 3-5 hafta sonrasında gerçekleştiğini göstermiştir (98). Yamasaki ve ark, (99) ile Stashenko ve ark, (100) total pulpal nekrozundan önce kökün apikal kısmında hala vital dokular bulunurken osteoklast sayısında artış, kemik yıkımı ve periapikal enflamatuar infiltrasyon varlığını göstermişlerdir. Bu araştırmaların biyolojik temeli, total pulpa nekrozundan önce periapikal alana birçok enflamatuar medyatörün, proenflamatuar sitokinin, kemokinin ve bakteriyel sitokinin geçişine yol açan pulpa enflamasyonu/enfeksiyonunun apikale doğru gelişmesine dayanmaktadır (101).

Akut apikal periodontitis doğal bağışıklık sisteminin, kök kanalından gelen irritanlara karşı aktif savunmasının ilk hattıdır. Akut apikal periodontitis, özgünlük ve hafıza gerektirmeyen, irritanlara karşı gösterilen acil bir savunma reaksiyonudur. Akut apikal periodontitisin karakteristik özellikleri tipik akut enflamatuar reaksiyona benzer ve damarlarda genişleme, damar içi basıncın artışı, lökositlerin kan damarlarından doku boşluklarına geçişi gibi olaylar görülmektedir. Akut enflamasyonda; lökositlerin fagositoz ile mikrobiyal ajanları yok etmek için hasarlı dokuya infiltrasyonu, hasarlı dokularda immünglobulinler, kompleman faktörler ve plazma proteinleri gibi humoral faktörlerin uyarılması ve birikimi ile daha çok nötrofil ve makrofaj toplanması, bakteriyel toksinler ile zararlı metabolik ürünlerinin parçalanması ve etkisizleştirilmesi gibi yararlı etkileri de mevcuttur (32,95).

2.1.6.1. Hücre Biyolojisi

Nötrofil, monosit/makrofaj, trombosit, mast hücreleri, T lenfositler, B lenfositler, doğal katil (NK) hücreler, dendritik hücreler, endotel hücreler, fibroblastlar, eozinofiller ve bazofiller gibi hücrelerin herbirinin ayrı fonksiyonları bulunmaktadır ve çeşitli biyokimyasal mesajlarla uyarılmaktadır (32,66,95). Hücre aktivasyonu, hücrelerin yeni fonksiyonlar geliştirebilmesi veya normal fonksiyonlarının yükseltilmesi şeklinde tanımlanmaktadır. Bu işlem için yeni gen proteinlerinin sentezi ve yeni genlerin transkripsiyonu gerekmektedir (66).

2.1.6.1.1. Mast Hücreleri

Mast hücrelerinin sitoplazmik granüllerinde depolanan histamin, akut enflamasyonda vazodilatasyonu ve damarsal geçirgenliği başlatmak için gerekli olan ilk medyatördür. Mast hücreleri akut enflamasyonu tetiklemektedir. Perivasküler doku aralıklarına geniş ölçüde yayılmışlardır ve kemik iliğinde bulunan öncül hücrelerden köken almaktadır. Olgunlaşmış mast hücreleri vazoaktif medyatörlerin kaynağı olan birçok sayıda sitoplazmik granül içermektedir. Soğuk, sıcak ve mekanik travma gibi fiziksel uyarılar dışında mast hücreleri Ig-E spesifik antijen, kompleman bileşikleri (C3a ve C5a), nöropeptid (SP) ve sitokinler (IL-1, IL-8) ile de uyarılmaktadır (32,66,95). Ayrıca uyarılmış mast hücreleri enflamatuvar savunma mekanizmasını geliştirmek için sitokin (TNF- α , IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13), prostaglandin ve lökotrien salgılamaktadır (66,102,103).

2.1.6.1.2. Endotel Hücreleri

Endotel hücreleri olmadan konak, doku hasarının olduğu bölgeye hücreler ve humoral savunma bileşenlerini gönderememektedir. Enflamatuvar medyatörler, kompleman bileşikleri, proenflamatuvar sitokinler, nitrik oksit, nöropeptidler ve bakteriyel toksinler endotel hücreleri etkileyerek, vazodilatasyon ve damar geçirgenliğinin artmasına yol açmaktadır (32,66,95). Aktif makrofajlardan ve NK hücrelerden salınan IL-1 ve TNF endotel hücrelerini uyararak hücreler arası adezyon moleküllerinin (ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3), vasküler hücre adezyon moleküllerinin (VCAM) ve platelet endotel hücresi adezyon moleküllerinin (PECAM) açığa

çıkmasına sebep olmaktadır. Bu moleküller lökositlerin endotel hücrelerine adezyonunu ve damar dışına geçişini sağlamaktadır (32,66,95,104). IL-1, TNF ve LPS endotel hücrelerini uyararak nötrofiller için kemotaktik bir medyatör olan kemokin (IL-8) sentezini sağlamaktadır (66).

2.1.6.1.3. PMN

Akut apikal periodontitiste esas etkin hücredir (105-107). Kemik iliği kök hücrelerinden köken almaktadır, çekirdekleri lobludur, sitoplazmalarında primer veya azurofil (elastaz ve miyeloperoksidaz) ve sekonder veya spesifik (lizozim ve diğer proteaz) granüller içermektedir (32,95,103). Nötrofiller sadece dolaşım sisteminde bulunmaktadır. Bu hücreler, kan damarları boyunca perivasküler doku aralıklarına ilk göç eden lökositlerdir, daha sonra hasarlı dokuya ve irritanlara doğru yönelmektedirler ve sayıları 24-48 saatte en yüksek seviyeye ulaşmaktadır.

Damarlarda genişleme ve geçirgenliğin artışı takip eden lökosit marjinyasyonu, yuvarlanma, yakalama ve aktivasyon sonrasında damar dışına geçiş olayları lökositler (L-selektin, integrinler) ve endotel hücrelerinden açığa çıkarılan hücre adezyon moleküllerinin (P ve E selektin, ICAM, VCAM, PECAM-1) karmaşık etkileşimleri ile düzenlenmektedir. Nötrofillerin yuvarlanması lökosit selektin liganları ve endotel hücreleri üzerindeki P-selektinler arasındaki etkileşimlerle ayarlanmaktadır. Lökosit yapışması, lökosit integrinleri ve endotel hücreleri üzerindeki ICAM ve VCAM arasındaki etkileşimlerle ayarlanmaktadır. Lökosit geçişi ise hem lökosit hem de endotel hücreleri üzerinde bulunan PECAM-1 arasındaki etkileşimlerle düzenlenmektedir (32). Endotel hücreleri ve bazal membran arasındaki birleşim yerinden doku aralığı içerisine geçişten hemen sonra nötrofilik lökositler bakteriyel ürünler (fLMP), C3a, C5a, lökotrien B4 (LTB4), platelet aktive edici faktör (PAF), fibrinopeptidler, ölü hücreler ve kemokinler (IL-8) gibi kemotaktik faktörler veya kemotaksinler tarafından oluşturulan uyarılara doğru yönelmektedir (32,66,95,96).

Nötrofilik lökositler, kısa ömürlü (saatler ile birkaçgün arasında) ve belirli bir süreliğine farklılaşmış hücrelerdir. Akut enflamatuar reaksiyonlarda, bu hücreler çoğunluğu apoptoz veya programlı hücre ölümü ile yok olmaktadır. Apoptotik

nötrofiller makrofajlar tarafından fagosite edilmektedir (32,95,108). Bununla birlikte, bazı nötrofilik lökositler, şiddetli mikrobiyal enfeksiyona karşı savaşta öldükten sonra doku içine, hücre içi proteolitik lizozomal enzimler, oksijen türevli aktif metabolitler, nitrik oksit, proenflamatuar sitokinler, eikonoidler ve matriks metalloproteinazlar (MMP) açığa çıkartarak doku hasarını ve enflamasyonu şiddetlendirmektedir (32,95). Apikal periodontitisin akut fazında doku çözülmesinin esas nedeni yoğun nötrofil birikimi ve ölümüdür (1). Nötrofilik lökositlerin esas fonksiyonları fagositoz, bakterilerin öldürülmesi ve enfeksiyonun yayılmasını önlemek için alanda daha çok lökositlerin birikmesini sağlamak amacıyla enflamatuar medyatörlerin (proenflamatuar sitokinleri de içeren) salgılanmasıdır (26).

2.1.6.1.4. Makrofajlar

Makrofajlar, akut apikal periodontitisin 48-96 saatlik ikinci dalgasında kendilerini göstermektedir. Monositler kan damarlarından dokulara geçerek makrofajlara dönüşmektedir. Olgun makrofajlar düzensiz şekilli çekirdeklere sahiptir ve çok sayıda lizozom ve fagositik vezikül (fagozom) içermektedir. Monositler, nötrofillerin endotel hücrelere bağlandığı mekanizmalara benzer şekilde adezyon molekülleri (makrofajlar için ICAM ve lenfositler için VCAM) açığa çıkaran endotel hücrelerine bağlanmaktadır. Sonrasında ise damar dışına çıkarak kemotaktik faktörlerin yönlendirmesi ile yaralanan dokuya doğru yönelmektedir (32).

Makrofajlar bakteriler, PAMP ve IFN- γ tarafından uyarılarak lizozomal enzimler, koagülasyon faktörleri, biyoaktif lipidler, reaktif oksijen türleri, kemokinler, sitokinler/büyüme faktörleri ve anjiyogenezis faktörleri gibi birçok ürün sentezlemektedir (32,95,96). Makrofajlar, en dinamik ve en becerikli lökositlerdir. Bakteri ve yabancı cisimlerin fagositozu, enflamatuar medyatörlerin üretimi, immün cevabın başlatılması, nekrotik hücre ve dokuların temizlenmesi, sistemik etkiler (ateş, akut faz reaksiyonu, kaşeksi), hücreleri etkileyen moleküllerin ve sitokinlerin sentezlenmesi, antibakteriyel ve antiviral mekanizmalarda olduğu gibi yara iyileşmesinde damarlanmanın sağlanması gibi birçok görevi bulunmaktadır (32).

Uyarılmış nötrofilik lökositler ve makrofajlar, fagositoz ve patojenleri öldürme konusunda oldukça yeteneklidir. Bu hücreler, mikroorganizmaları yüzeylerinde bulunan C3b kompleman bölümlerinin yanı sıra TLR'leri ve IgG'nin Fc bölümünün reseptörleri ile tanımlamaktadır. C3b opsonizasyonu ve mikroorganizmaların antikor ile kaplanması, nötrofilik lökositler ve makrofajlar tarafından tanınmayı ve fagositozu arttırmaktadır (32,66,95). Nötrofilik lökositler, fagositoz ve ekstrasellüler mikropların yok edilmesinde etkilidir fakat TH1 ve NK hücrelerin ürettiği IF- γ tarafından aktive edilen makrofajlar fagositoz ve hücre dışı mikropların öldürülmesinde daha etkilidir (66).

Fagositize edilen mikroplar hücre içinde membran bağlı fagozomlar ile çevrelenerek daha sonra lizozomlar ile birleşirler. Mikroorganizmalar, yabancı protein antijenleri ve ölü hücreler gibi irritanlar, lizozomların içinde depolanan proteolitik enzimler ile parçalanmaktadır (66). Nötrofiller ve makrofajlar tarafından salgılanan lizozomal enzimler, reaktif oksijen ara ürünleri ve nitrik oksit bakterilerin yanında gelişmiş olarak doku hücrelerine de zarar vermektedir. Periapikal dokudaki hasarın çoğunluğu akut enflamasyon esnasında görülmektedir. Akut enflamasyon, bakteri ve toksinlerinden ziyade nötrofilik lökositlerden ve makrofajlardan salgılanan proteolitik lizozomal enzimler ve matriks metalloproteinazlar ile ilişkilendirilmektedir (1,32,66).

2.1.6.1.5. Trombositler

Normalde dolaşım içerisinde bulunan, megakaryositten köken alan ve enflamasyonda önemli rol oynayan küçük sitoplazmik bölümlerdir (103). Trombositler, pıhtılaşma, hemostaz ve fibrinoliz için gerekmektedir. Ayrıca, enflamasyon sırasında vazoaktif aminler (PAF, serotonin), kemokinler ve büyüme faktörleri (Platelet kaynaklı büyüme faktörü:PDGF, fibroblast büyüme faktörü:FGF, dönüştürücü büyüme faktörü:TGF) üretmektedir.

2.1.6.1.6. NK Hücreler

NK hücreler, kemik iliği kök hücrelerinden köken alan lenfositlerin alt grubudur ve akut apikal periodontitiste görev almaktadır, ancak antijen tanımlaması

için gerekli olan özgün T hücre reseptörlerinden yoksundur (66). NK hücreler mikrobiyal yapılar ve ürünleri için TLR'lere sahiptir. NK hücrelerin fonksiyonları sınıf I MHC moleküllerinin ekspresyonu olmadan virüs ile enfekte hücreleri yok etmek ve makrofajları uyararak için IFN- γ salgılamaktır. Antikor kaplanmış hücreler, virüsle enfekte hücreler, bazı hücre içi bakteriler ve aktive olmuş makrofajların salgıladığı IL-2, NK hücreleri uyarmaktadır. Apikal periodontitis lezyonlarından virüsler izole edilmiştir (109,110). NK hücreler antikordan bağımsız hücre aracılı sitotoksite ile hedef hücreleri yok etmektedir çünkü NK hücreler IgG'nin Fc bölümü için reseptör açığa çıkarmaktadır (66). NK hücreler doğuştan gelen ve kazanılmış bağışıklık sistemleri arasında bir bağlantı kurmaktadır.

2.1.6.2. Enflamatuar Medyatörler

Enflamatuar medyatörler genellikle plazma ve hücrelerden köken almaktadır. Temel biyolojik etkileri damarlarda genişleme, damar geçirgenliğinde artış ve nötrofilik lökosit ve makrofaj gibi enflamatuar hücreleri hasarlı doku bölgesine toplamaktır. Bazı medyatörler, doku hasarına da yol açmaktadır.

Bradikinin, kinin sistemi aktivasyonunun; fibrinopeptidler, pıhtılaşma sistemi aktivasyonunun, fibrin parçalanma ürünleri ise fibrinolitik sistem aktivasyonunun ürünleridir. Kinin, fibrinolitik ve pıhtılaşma sistemi aktive olmuş Hageman faktörü ile başlatılmaktadır. Prostaglandinler ve lökotrienler araşidonik asit metabolizmasının ürünleridir. Uyarılmış fosfolipaz A2 hücre membranı fosfolipid moleküllerini araşidonik asit ve platelet aktive edici faktör olarak ikiye böler. Araşidonik asit moleküllerinden siklooksijenaz yolu ile prostoglandinler ve tromboksan, lipoksijenaz yolu ile lökotrienler üretilmektedir (32,95).

C3a, C3b, C5a, C5b ve C5-C9 gibi kompleman bileşenleri iki yolla aktive edilen kompleman sistemi ürünleridir. Klasik yol özel antijen ile birleşmiş IgG veya IgM'in C1'i aktive etmesi, diğer yol ise mikrobiyal hücre komponentleri (lipopolisakkarit, teiokoik asit) ve plasmin ile başlatılmaktadır. C3a ve C5a, mast hücrelerini ve bazofilleri uyararak histamin salınımını sağlayan anaflatoksinlerdir. Fagositlerin lizozomal enzimlerini boşaltmalarına da sebep olurlar. C3b bir opsonindir ve bakterileri kaplayarak fagositler tarafından fagositozunu arttırmaktadır.

C5a nötrofiller için güçlü bir kemotaksindir. C5b-C9 membran saldırı kompleksidir, bakteri ve konak hücresi membranı üzerinde aktive olursa hücrelerin parçalanmasına yol açmaktadır (32,95).

İmmünoenflamatuar yanıt, enflamatuar medyatörlerin yanı sıra, çeşitli sitokin ve kemokinlerin salgılanma miktarına ve zamanlamasına bağlıdır. IL-1, TNF, IL-6, IL-12 ve IFN- γ akut enflamatuar yanıtta yer almaktadır (32,66,111). IL-6 aktif mononükleer fagositler, endotelial hücreler ve fibroblastlar tarafından mikrobiyal enfeksiyona ve IL-1 ile TNF gibi diğer sitokine yanıt olarak üretilmektedir. IL-6 hepatositlerden akut faz proteinlerinin sentezini uyarmaktadır (66). IL-12 'nin ana kaynağı aktif mononükleer fagositler ve dendritik hücrelerdir. IL-12 doğal ve kazanılmış bağışıklık yanıtları arasında bir bağlantı sağlamaktadır (66). IFN- γ aktif NK hücreler, TH1 hücreleri ve TC hücreleri tarafından üretilmektedir. Makrofajları aktive edebilirler ve öldürme yeteneklerini arttırabilirler. IL-1 β ve TNF kronik apikal periodontitiste apikal kemik rezorpsiyonu ile ilişkilendirilmektedir (112).

Kemokinler lökositlerin kan damarlarından doku aralığına geçişini düzenleyen ve lökosit hareketliliğini uyaran sitokinler ile aynı ailedendir (66). Kemokinler, lökositler, endotelial hücreler ve fibroblastlar tarafından üretilmektedir. Kemokinlerin salınımı mikrobiyal enfeksiyon, TNF ve IL-1 ile başlatılmaktadır (66,111,113). Farklı lökositler farklı kemokin reseptörleri açığa çıkarmaktadır (66).

Nöropeptidler, çeşitli uyaranlara karşı afferent duyu nöronlarının akson refleksi yoluyla salınmaktadır. Histamin, kininler, prostoglandinler ve proenflamatuar sitokinler, nöropeptid salınımı için duyu sinirlerin hassaslaştırılması ve aktivasyonunu sağlayabilmektedir (74,79,114-116).

2.1.6.2.1. IL-1

IL-1, geniş biyolojik etkileri olan proenflamatuar bir sitokindir. IL-1'in sistemik etkileri toksik şokta gözlenen olaylar ile aynıdır. Lokal olarak ise endotel duvarına lökosit adezyonunun arttırılması, lenfositlerin etkinleştirilmesi, nötrofillerin etkisinin arttırılması, prostoglandinlerin ve proteolitik enzimlerin üretiminin başlatılması, kemik yıkımının artması ve kemik yapımının azaltılması gibi etkileri

bulunmaktadır. IL-1 α , IL-1 β ve IL-1 reseptör antagonisti (IL-1Ra) olarak üç farklı IL-1 bulunaktadır. IL-1 α , ratların periapikal lezyonlarında baskın olarak yer almaktadır (117,118).

İnsanlarda periapikal lezyonlarda en sık IL-1 β formu bulunaktadır (119-122). IL-1 β , IL-1 α ile karşılaştırıldığında daha kuvvetli proenflamatuar özelliklere sahiptir ve 10-50 kat daha fazla seviyede üretildiği bulunmuştur (123). Kemik rezorpsiyon kapasitesi ise IL-1 α 'dan 13, TNF- α veya TNF- β 'dan 1000 kat daha yüksektir (124). IL-1 β daha çok monosit/makrofaj ve PMN tarafından üretilmektedir. Ayrıca epitel hücreleri, keratinositler, fibroblastlar, B lenfositler ve osteositler tarafından da üretilmektedir (125). Mikroorganizmalar ve ürünleri, antijenler ve enflamatuar ajanlar bu sitokinlerin salınımına yol açmaktadır. IL-1 β , T lenfositlerin uyarılmasında ve lenfosit üretiminde, B lenfositlerin çoğalması ve antikor üretiminde, fibroblastların çoğalmasında, monosit ve fibroblastlardan PGE2 üretiminin uyarılmasında rol oynamaktadır. Nötrofillerin kemotaksisi, etkinleştirilmesi ve endotel hücrelerinin işlevlerine etki etmektedir. Bunun yanında osteoklast oluşumu ve kemik rezorpsiyonuna katkı sağlamaktadır. Deneysel periapikal lezyon çalışmaları IL-1 β , IL-1 α ve TNF- α gibi sitokinlerin varlığının periapikal lezyonların genişleme sürecinde hızlı bir şekilde arttığını göstermektedir (126).

2.1.6.3. Klinik Özellikler

Akut apikal periodontitis vakalarında dişler genellikle semptomatiktir, ısırma ve perküsyona karşı hassastır. Ağrı, enflamatuar medyatörler, proenflamatuar sitokinler, sinir büyüme faktörleri ve basınç aracılığıyla nosiseptif duyu sinir liflerinin hassaslaşması ve uyarılması ile başlatılmaktadır (127). Enflame periapikal dokularda duyu sinir liflerinin filizlenmesi apikal periodontitisli dişlerde duyarlı alanı arttırabilmektedir (128). Kemik, sement ve dentin bütünlüğü bozulmadığından bu aşamada periapikal değişimler radyografik olarak tespit edilememektedir.

2.1.7. Asemptomatik Apikal Periodontitis: Apikal Granülom, Kronik Apikal Periodontitis

Kök kanalındaki patojenler yok edilmez ise semptomatik apikal periodontitis, asemptomatik apikal periodontitise dönüşmektedir. Asemptomatik apikal periodontitis, enflamatuar uyarıların devamlılığı, konak cevabının uyarana adaptasyonu, kazanılmış bağışıklık yanıtının varlığı ve tamir olaylarının başlaması ile karakterize edilmektedir (32,95,96,129). Kronik enflamasyon, konak savunmasının mikroorganizma ve toksinlere karşı koyabilme yeteneğini devam ettirmesi açısından iyi bir durumken, konak cevabının bu faktörleri elimine etmekte yetersiz kalması ise kötü bir durumdur (95).

Geleneksel olarak, “asemptomatik kronik apikal periodontitis” ve “periapikal granülom” terimleri birbirinin yerine kullanılmaktadır. Granülom, kronik enflamatuar reaksiyon için kullanılan histolojik bir terimdir ve granülatöz enflamasyon alanıdır (32,95,130). Granülatöz enflamasyon, tüberküloz, cüzzam, sifiliz, kriptokokkozis, sarkoidozis, romatizmal ateş ve yabancı cisim granülomu gibi hastalıklarda, modifiye epiteloid hücrelerle birlikte aktif makrofajların bulunması ile karakterizedir (32,33,95,131). Granülom, göreceli olarak damarsızken, apikal periodontitis oldukça damarlı bir yapıya sahiptir. Histolojik olarak, bazı kronik apikal periodontitis vakalarında granülatöz enflamasyonun bazı özellikleri görülebilmektedir fakat bu durum her vakada yoktur. Bu nedenle apikal granülom ve asemptomatik kronik apikal periodontitis terimlerinin birbirinin yerine kullanılması yanlıştır. Granülom, yabancı cisim granülom veya immün granülom gibi kronik enflamasyonun özel formlarını tanımlamak için histolojik bir terim olarak kabul edilmektedir (32,95).

Yabancı cisim reaksiyonu, kök kanal dolgu maddeleri, kâğıt konlar, pamuk lifler ve cerrahi süturlar gibi yabancı cisimlerin tetiklediği kronik enflamasyonun özel bir alt tipidir (32,54,95,129). Aktif makrofajlar, sindirilemeyen yabancı cisimlerin yüzeyinde birleşip dev hücrelere dönüşerek, lizozomal enzimler, enflamatuar medyatörler ve proenflamatuar sitokinler salgılamaktadır. Ayrıca yabancı cisimler de bakteriyel biyofilm kaynağı olarak (132) veya enfeksiyonu başlatmak için bakteri enfeksiyöz dozunu düşürerek katkı sağlamaktadır. Yabancı

cisimler enfeksiyonu tedaviye karşı dirençli hale getirebilmektedir çünkü biyofilmdeki bakteriler, kendilerini konak savunma mekanizmalarına ve antimikrobiyal ajanlara karşı dirençli ince bir tabaka biyopolimer ile kaplamaktadır (32).

2.1.7.1. Hücre Biyolojisi

2.1.7.1.1. Makrofaj

Makrofajlar geçmişte retikulo-endotelyal sistem olarak bilinen mononükleer fagositik sistemin farklılaşmış temel hücrelerini temsil etmektedir. Makrofajlar, mikroorganizmalar, mikroorganizmaların ürünleri (LPS), kimyasal mediyatörler veya yabancı parçacıklar tarafından etkinleştirilmektedir.

Asemptomatik apikal periodontitiste rol oynayan esas hücreler makrofaj ve lenfositlerdir. Makrofajlar doğuştan gelen bağışıklık cevabında mikroorganizmaları, ölmüş hücreleri ve yabancı cisimleri fagositize etmektedir ve uyarılara karşı konak savunmasını geliştirmek için enflamatuvar medyatörleri ve proenflamatuvar sitokinleri üretmektedir. Makrofajların salgıladığı medyatörlerden IL-1, TNF- α , IFN ve büyüme faktörleri apikal periodontitiste önemlidir. Enflamasyonda önemli olan prostaglandin ve lökotiren gibi serum bileşenleri ve metabolitlerine katkıda bulunmaktadırlar. Kazanılmış bağışıklıkta ise antijen sunan hücre (APC) olarak görev yapmaktadırlar. Bu hücreler fagositoz yapmaktadır ve MHC ile ilişkili işlenmiş yabancı antijenleri T hücrelerine sunmaktadır.

2.1.7.1.2. Lenfositler

Lenfositler, kan kökenli ve bağ dokuda yer alan hücrelerdir (32). Lenfositler farklı antijenik belirteçleri özgün olarak ayırt etme ve tanıyabilme kapasitesine sahip vücuttaki tek hücre çeşididir. Kazanılmış bağışıklık yanıtının özgünlük ve hafıza olarak tanımlanan iki karakteristik özelliğinden sorumludurlar.

T-lenfosit ve B-lenfositler apikal periodontitiste önemli lenfositlerdir. Bunhücreler geleneksel boyama veya mikroskobik inceleme ayırt edilemezler ancak

monoklonal antikorların kullanımı ile yüzey reseptörlerine göre ayrımları yapılabilmektedir.

T-Lenfositler: Timusten köken alan T lenfositler, etkilerine veya görevlerine göre gruplandırılmaktadır. B hücreleri ile birlikte çalışan T hücreleri T-helper, diğer hücreler üzerine toksik ve baskılayıcı özellikleri olan T hücreler ise T-sitotoksik/baskılayıcı hücreler olarak adlandırılmaktadır. T-helper hücreler CD4+ ve sitotoksik T hücreleri ise CD8+ dir. CD4+ hücreler Th1 ve Th2 olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Th1, IL-2 ve interferon- γ (IFN- γ) üretmektedirler ve immün cevabın hücresel bölümünde görev almaktadırlar. Th2 hücreler ise IL-4, 5, 6 ve 10 salgılamaktadırlar ve plazma hücrelerinden salınan antikorları düzenlemektedirler.

B-Lenfositler: B lenfositler, doğrudan antikor üretiminden sorumlu hücrelerdir. Antijenlerden ve Th2 hücrelerden alınan sinyallerle bazı B hücreleri plazma hücrelerine dönüşerek antikor üretimini ve salınımını sağlamaktadır.

2.1.7.1.3. Dendritik Hücreler

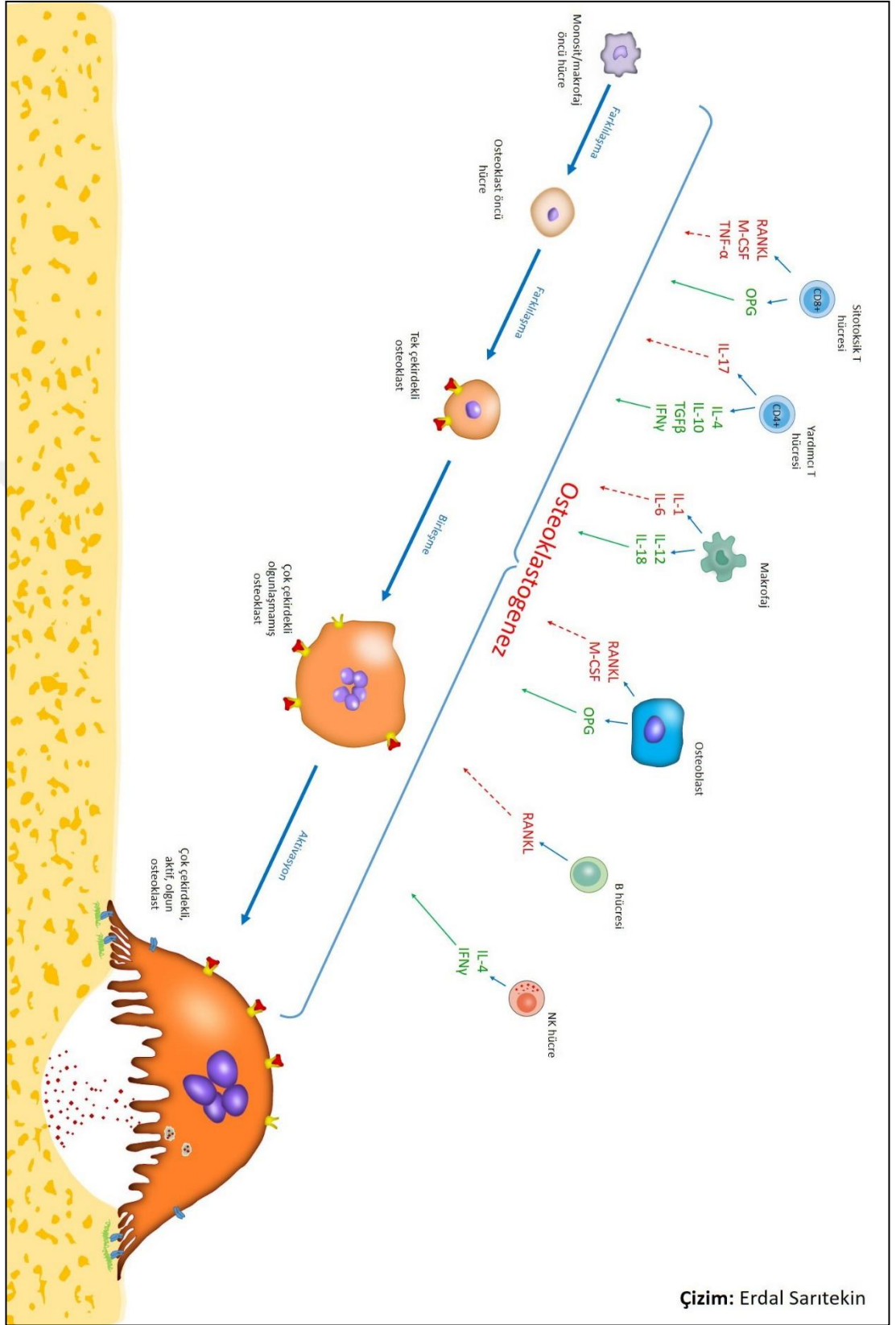
Dendritik hücreler, kemik iliğinden köken alan yardımcı immün hücrelerdir ve mononükleer fagosit hattı ile ilişkilidir (66). Bu hücreler, T lenfositler için antijen sunan hücreler olarak görev yaparlar ve kazanılmış bağışıklık yanıtın başlatılmasında rol alırlar (66). Aktif dendritik hücreler, IL-12 üretmektedir. Dendritik hücrelerin asemptomatik apikal periodontitis lezyonlarında önemli görevleri olduğu hayvan deneylerinde gösterilmiştir (107,133).

2.1.7.1.4. Osteoklastlar ve Apikal Periodontitiste Kemik Yıkımı

Periapikal kemik yıkımı asemptomatik apikal periodontitisin ayırt edici özelliğidir. Kemik rezorpsiyonu osteoklastlar tarafından oluşturulmaktadır. Apikal periodontitisin kronik safhasında, hem osteoklast hem de osteoblast aktivitesi azalmaktadır (134) bu nedenle periapikal osteolitik lezyon aynı seviyede kalmaktadır. Hayvan çalışmalarında, deneysel olarak pulparı ağız ortamına açılmış dişlerde 7. günde periapikal kemik hasarı gözlenmiştir. Kemik yıkımı 10. ve 20. günler arasında hızlı seyrederken daha sonra yavaşlamaktadır (134). Kemik yıkımının durağan dönemi asemptomatik apikal periodontitis ile

ilişkilendirilmiştir (134). Proenflamatuar sitokinler, IL-1, TNF ve IL-6 osteoklast progenitor hücrelerinin osteoklastlara farklılaşmasına aracılık etmektedir ve bu sitokinlerin ortamda yüksek miktarlarda bulunması aktif kemik yıkım periyodu ile ilişkilendirilmektedir (135).

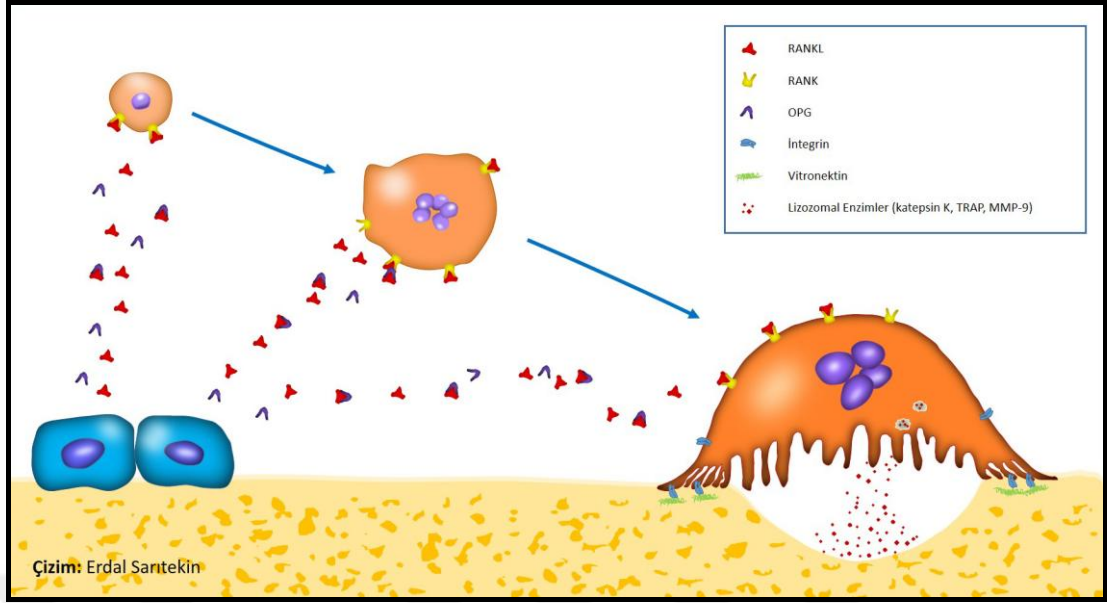
Osteoklast oluşumu, kemik iliğindeki monosit-makrofaj hücre ailesinden osteoklast öncüllerinin farklılaşmasını içermektedir. Granülosit/makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF), RANKL, OPG, IL-1, IL-6, TNF, prostoglandinler, bradikinin, kallidin ve trombin gibi birçok sitokin ve büyüme faktörünün osteoklast farklılaşmasında etkili olduğu gösterilmiştir (136-140). Paratiroid hormon osteoblastların GM-CSF ve RANKL yapımını uyarmaktadır. Kemik ve T hücreleri de RANKL üretebilmektedir. Tek çekirdekli osteoklast öncü hücrelerin farklılaşması, çok çekirdekli osteoklast hücrelerinin birleşerek kemiği rezorbe edebilen osteoklastlara dönüşmesi ile son bulmaktadır (resim 1).



Resim 1. Osteoklast farklılaşması ve aktivasyonu

RANKL (5,6), RANK (7) ve OPG (8,9)'nin keşfedilmesi osteoklastların farklılaşması ve işlevlerinin nasıl düzenlendiğini ortaya çıkarmıştır. RANK, RANKL ve OPG, TNF ligand ve reseptör ailesinin üyeleridir. RANK, bir transmembran proteindir ve osteoklast öncüllerine RANKL'in bağlanmasını sağlayan tek reseptördür. Osteoklastojenez ve kalsiyum metabolizmasını kontrol etmektedir. Makrofaj, T ve B lenfositler, fibroblastlar, dendritik hücreler ile öncül ve olgun osteoklastların yüzeyinde bulunmaktadır (7,141). RANKL, kemik, kemik iliği ve lenfoid organlardan, osteoblastlar, fibroblastlar, aktif T ve B hücrelerinden salınan bir peptittir. Hücrel ve çözünebilir olmak üzere iki formu bulunmaktadır. Temel işlevi osteoklast öncül hücreleri üzerindeki RANK yollarını aktifleştirerek osteoklast farklılaşması ile aktivitesini uyarmak (5-7) ve apoptozunu engellemektir. OPG, osteoblastlar, kardiyovasküler sistem, böbrek, karaciğer, dalak, beyin, akciğer ve kemik iliği gibi birçok doku ile hematopoetik ve bağışıklık sistemi hücreleri tarafından sentezlenmektedir. OPG, RANKL'a bağlanarak bir tuzak reseptör gibi fonksiyon görmektedir ve RANKL'ın RANK'a bağlanmasını engellemektedir. Bu sayede osteoklast farklılaşması ve aktivasyonu gerçekleşmemektedir ve kemik yıkımı önlenmektedir (8,9). RANKL-RANK uyarımı fizyolojik osteoklast gelişiminde ve patolojik kemik yıkımında önemli rol oynamaktadır (142).

Olgun osteoklastlar, osteoblastların salgıladıkları kemotaktik faktörlerin etkisi ile mineralize kemik yüzeyine tutunurlar. Osteoklastlar, integrin süper ailesi üyesi "vitronektin reseptör" ile kemiğe tutunurlar. "vitronektin" açık mineralize kemik yüzeyindeki osteopontin, kemik siyaloprotein ve fibronektin gibi ekstraselüler matriks proteinleri için bağlayıcı alanlar içerir. Osteoklastlar ekstraselüler matrikse bağlandığında bu alanı asitleştirir. Daha sonra osteoklastlar proteolitik lizozomal enzimleri ve karbonik anhidraz salgılayarak kemikteki mineralize ve mineralize olmayan komponentleri çözmektedir (137,143-145)(resim 2).



Resim 2. Kemik yıkımında RANK, RANKL ve OPG

Dental sert doku yıkımından sorumlu hücreler odontoklastlar olarak adlandırılmaktadır (146). Ultrastrüktür ve gen çalışmalarında odontoklastların ve osteoklastların benzer olduğu gösterilmiştir (147). Bu nedenle, kemik, sement ve dentin rezorbsiyon mekanizmalarının benzer olduğuna inanılmaktadır (147). Yine de odontoklast öncülleri nasıl görüldüğü ve dentin ve sement yıkımı yapan odontoklastların farklılaşma ve aktivasyonuna neyin yol açtığı hakkında çok az şey bilinmektedir.

2.1.7.1.5. Malessez Epitel Artıkları

Apikal periodontitis lezyonlarının %30-52'si prolifer olmuş malessez epitel artıkları (ERM) içermektedir (148). Periapikal enflamasyon sırasında epitel hücre artıklarının sitokinler ve büyüme faktörleri tarafından uyarıldığına inanılmaktadır. Bölünme ve çoğalma ile oluşan bu olay, enflamatuvar hiperplazi olarak tanımlanmaktadır. Bu hücreler, epitel kaynağı gibi hizmet ederek radiküler kist patogenezinin katılmaktadır.

İmmünoenflamatuvar yanıt süresince büyüme faktörleri ve sitokin üretiminin uyarılması bu hiperplaziye yol açmaktadır. Hiperplazi kendiliğinden sınırlanan bir süreçtir ve uyarı ortadan kaldırıldığında geriye dönmektedir (32,95,96). Periapikal enflamasyon sırasında, doğuştan gelen ve kazanılmış bağışıklık sistemi hücreleri ve

stromal hücreler (aktive olmuş makrofajlar, nötrofilik lökositler, NK hücreler, T hücreleri, fibroblastlar), birçok enflamatuar medyatör (prostoglandin, histamin), proenflamatuar sitokin (IL-1, IL-6, TNF) ve büyüme faktörü (PDGF, epidermal büyüme faktörü: EGF, keratinosit büyüme faktörü: KGF, FGF) üretmektedir. Bu enflamatuar medyatörler, proenflamatuar sitokinler ve büyüme faktörleri epitelyal artıkların proliferasyonunu uyarma kapasitesine sahiptir.

2.1.7.1.6. Fibroblastlar

Kronik enflamasyonda ve yara iyileşmesinde önemli hücrelerdir. Farklılaşmamış mezenşimal hücrelerden köken alırlar ve tüm bağ dokuda yer almaktadırlar. Bu hücreler, proteoglikan, glikoprotein ve çeşitli tipteki kollajen ile elastin öncül moleküllerini sentezleyip salgılamaktadırlar (103). Kronik enflamasyonda aktif trombositler, makrofajlar, endotel hücreleri ve enflamatuar hücreler tarafından üretilen birçok büyüme faktörü (TGF- β , PDGF, EGF, FGF), IL-1 ve TGF- α gibi fibrojenik sitokinler, fibroblast migrasyonunu ve proliferasyonunu tetiklemektedir (32,95). Yeri geldiğinde, aktif fibroblastlar IL-1, IL-6 ve GM-CSF gibi lökosit gelişimini etkileyen bir dizi sitokin üretmektedir. Ayrıca ekstrasellüler matriks proteinlerini çözen matriks metallaproteinazları da üretmektedirler (32,130).

2.1.7.2. Histopatoloji

Aseptomatik apikal periodontitis lezyonlarında makrofajlar ve lenfositler baskın hücrelerdir. Nadiren, bütünlüğü bozulan hücre zarının ürünleri (kolesterol kristal birikintileri) ile ilişkili köpüksü makrofajlar ve dev hücreler de görülebilmektedir. Tüm apikal periodontitis lezyonlarının yaklaşık %18-44'ünde kolesterol kristalleri bulunmaktadır (149,150). Çok hücreli osteoklastlar, bazen rezorptif Howship's lakünlerinde bulunabilmektedir. Aseptomatik apikal periodontitis lezyonlarında sıklıkla epitel hücre artıklarının proliferasyonu görülmektedir. ERM' nin üç boyutlu proliferasyonu ile düzensiz epitel kenarları ve adacıklar oluşmaktadır. Aseptomatik apikal periodontitisin temel özelliği fibrovasküler granülasyon dokusunun proliferasyonudur. Bu doku,

enfeksiyon/enflamasyonun yayılmasını engelleyerek yaralanmış periapikal dokuları tamir etmektedir.

Apikal periodontitiste, sement dokusundaki değişikliklerle ilgili bilgiler sınırlıdır. Simon ve ark, taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanarak, kök kanal enfeksiyonlarında, sement dokusunda gelişmiş güzel olarak dağılmış çöküntüler, yükselteler ve sement lifleri bulunduğunu gözlemlemiştir (151). Mineralize çıkıntılar, sement lakünlerinde ve yüzey rezorbsiyonlarında artış ve liflerde azalma söz konusudur. Tüm bu değişiklikler, ekstraradiküler enfeksiyonlarda apikal kök yüzeyine bakteriyel biyofilmin tutunabilmesi için oldukça uygun koşullar sağlamaktadır. Asemptomatik apikal periodontitis lezyonlarında genellikle sement ve dentinde eksternal kök rezorbsiyonu görülmektedir (151,152). Enflamatuvar olaylarda sement ve dentin, kemiğe göre daha az rezorbe olmaktadır.

Işık mikroskobu, geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ve mikrobiyolojik kültür çalışmalarında, birçok asemptomatik apikal periodontitis lezyonunda bakterilerin bulunduğu gösterilmiştir (39,41,153,154). Nair, TEM araştırmasında, birçok asemptomatik apikal periodontitis lezyonunda bakteri gözlenmediğini bildirmiştir (41). Enflame periapikal dokularda bakteri varlığı söz konusuysa, genellikle fagositler içerisinde bakterilere rastlanmaktadır (101).

2.1.7.3. Klinik Özellikler

Hastalığın kronik fazı süresince kemik yıkımının olmaması veya azaltılması ve kollajenli bağ dokusunun tamir edilmesi yıkım sürecinin azaldığını göstermektedir. Bu nedenle kronik lezyonlar uzun süre büyük radyografik değişimler olmadan, belirti vermeden ve hareketsiz kalabilmektedir.

Kronik apikal apse ve fistül oluşumu genellikle asemptomatiktir. Bazen, fistül yolu kök yüzeyi boyunca ilerleyerek dişeti oluğuna açıldıktan sonra apikal apse buradan drene olmaktadır. Bu durum, dar ve derin yalancı cep oluşumuna yol açabilmektedir ve sıklıkla vertikal kök kırığı veya periodontal cebi taklit edebilmektedir.

2.1.8. Asemptomatik Apikal Periodontitis: Radiküler Kist, Kronik Apikal Periodontitis

Radiküler kistler, enflame periodontal ligament içinde epitel hücre artıklarının proliferasyonu ile oluşmaktadır (155-157). Radiküler kist, apikal periodontitis lezyonlarında görülen, kalınlığı değişkenlik gösteren, keratinize olmayan çok katlı skuamöz epitelle döşeli, üç boyutlu patolojik bir kavitedir. Apikal periodontitis lezyonları arasında kistlerin görülme oranının %6-55 oranında değişiklik gösterdiği bildirilse de özenli yapılmış seri kesitler ve katı histopatolojik esaslara bağlı kalınarak yapılan araştırmalar (148,158) kistlerin gerçek görülme oranının %20'nin altında olabileceğini göstermektedir. Radiküler kistler; epitelle çevrelenmiş kist boşluğu kapalı (gerçek kistler), epitelle çevrelenmiş kist boşluğu kök kanalına açılan (bay kistler, periapikal cep kistleri), olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır (148,158). Kistik lezyonların yarısından fazlası gerçek apikal kistlerdir. Geriye kalanlar ise apikal cep kistleridir (148,158). Her iki kist tipinin yapısal özellikleri oluşumlarına yol açan patolojik yolların farklı olmasına bağlanabilmektedir.

Radiküler kist, WHO Çene Kistleri, Odontojenik Tümörler ve Benzer Lezyonların Histolojik Sınıflaması' na göre enflamatuvar olarak kabul edilmektedir (159).

2.1.8.1. Hücre Biyolojisi

Radiküler kist vakalarında tüm kronik enflamatuvar hücre tipleri görülürken, en baskın olanı epitel hücreleridir. ERM, unipotent veya sınırlı potansiyele sahip kök hücreler olarak kabul edilmektedir. Bu hücreler, simetrik ve simetrik olmayan şekillerde bazal hücrelerine ve suprabazal skuamöz hücrelere bölünebilmektedir (157).

Gerçek kistlerin oluşumunun üç safhada gerçekleştiği kabul edilmektedir (160). İlk safhada etkin olmayan epitel hücre artıklarının lezyonun çevresindeki çeşitli hücrelerden salınan büyüme faktörlerinin etkisi altında proliferasyon oldularına inanılmaktadır (161-163). İkinci safhada epitelle döşeli kist boşluğu meydana gelmektedir. Kist boşluğunun oluşması ile ilgili çeşitli hipotezler mevcuttur. Beslenme eksikliği teorisi; merkezdeki hücrelerin epitel kenarlarının

besin kaynaklarından uzaklaşarak nekroza ve likefaksiyon dejenerasyonuna uğramasını temel almaktadır. Oluşan ürünler, nekrotik alana nötrofilleri ve granülositleri çekmektedir. Dejenere epitel hücreleri, infiltre olan lökositler ve doku eksudalarından oluşan mikrokaviteler bütünleşerek çok katlı skuamöz epitel ile döşeli kist boşluğunu oluşturmaktadır (155). Apse teorisi; doku nekrozu ve yıkımı ile oluşan apsenin epitel ile çevrelenmesini esas almaktadır. Çünkü açık bağ dokusu yüzeyini çevreleme özelliği epitel hücrelerinin doğasında bulunmaktadır. Epitelyal ipliklerin bağlanma teorisi; üç boyutlu küresel yapıdaki fibrovasküler bağ dokusunu oluşturmak için epitelyal ipliklerin her yönde proliferasyonu olduğunu önermektedir. Fibrovasküler bağ dokuda çeşitli derecelerde enflamatuar hücreler bulunmaktadır ancak kan desteğinden yoksun olması nedeniyle hücreler genellikle parçalanmaktadır. Böylelikle kist kavitesi oluşmaktadır (157). Üçüncü fazda kist büyümektedir, ancak bu mekanizma tam olarak açıklanamamaktadır.

Kist oluşumunda moleküler esaslar lehindeki geçmiş deneyimler (164-167) ozmotik basınca bağlı teorilerin (168-170) gözden düşmesini sebep olmuştur. Ayrıca enfekte kök kanalına açılan apikal cep kistlerinin de büyüebilmesi, radiküler kist gelişimindeki potansiyel faktör olarak düşünülen ozmotik basınç teorisini çürütmektedir (41,148). Henüz direkt bir kanıt olmamasına rağmen doku dinamikleri ve hücresel bileşenler, kistin genişlemesi için olası moleküler yollardır. Uyarılmış nötrofiller, fibroblastlar ve makrofajlar tarafından üretilen matriks metalloproteinazların fibröz bağ dokusu kapsülünü parçalaması ve kemikte rezorpsiyon sonucu radiküler kistler genişlemektedir. Kist lümenindeki nötrofillerin canlılığını yitirmesi ile prostoglandinler için sürekli bir kaynak sağlanmaktadır (171). Prostoglandinler, pöröz epitel duvarını geçerek çevre dokulara yayılmaktadır. Epitel dışındaki alanda bulunan hücreler çok sayıda T lenfosit (172) ve özellikle IL-1 β gibi sitokinler üreten makrofajlardan oluşmaktadır. Prostoglandinler ve enflamatör sitokinler osteoklastları uyarak kemik yıkımına yol açmaktadır. İnsan periapikal kistlerinde efektör moleküllerin (MMP-1 ve 2) varlığı rapor edilmiştir (167).

2.1.8.2. Enflamatuar Medyatörler

Medyatörler, kronik apikal periodontitiste bulunan medyatörlerle benzerdir.

2.1.8.3. Histopatoloji

Apikal kistler, fibrovasküler bağ doku kapsülünden bazal membran ile ayrılan çeşitli kalınlıklardaki hiperplastik, keratinize olmayan çok katlı skuamöz epitelle çevrilidir. Kök kanallarındaki veya periapikal dokulardaki kemotaktik irritanlar sebebiyle ortama gelen enflamatuar hücreler epitel ve bağ doku kapsülüne yerleşmişlerdir. Prolifere olmayan epitelde daha az enflamatuar hücre infiltrasyonu görülmektedir. Örtücü epitel hücreleri neoplastik değişikliklerin karakteristik özelliklerini göstermemektedir. Odontojenik keratokistler ve kalsifiye odontojenik kistlerin aksine, epitelle örtülü radüküler kistlerin bazal hücreleri periapikal enflamasyon sırasında doğuştan gelen ve kazanılmış bağışıklık yanıt hücreleri tarafından salınan büyüme faktörleri ve sitokinlerin uyarımı olmadan proliferasyonlanmamaktadır. Kist lümeni enflamatuar eksuda, kolesterol kristalleri, berrak sıvı veya bakteri kolonileri içermektedir (148,173).

2.1.8.4. Klinik Özellikler

Etkilenmiş diş genellikle asemptomatiktir. Endodontik olarak etkilenmiş dişlerde periapikal lezyonlar genellikle radyopak sınırlı, sınırları düzgün bir radyolusensi göstermektedir.

2.2. Melatonin

Kimyasal adı “*N-asetil-5-metoksi triptamin*” olan melatonin karanlık ortamda epifiz bezden salgılanan bir hormondur. Uyku düzeni, sirkadyen ritim, bağışıklık sistemi ve üreme fonksiyonu gibi birçok biyolojik olayın düzenlenmesinde etkilidir. Melatonin en çok metabolizmada günlük değişimlere ve ışığa duyarlı canlılarda üreme yetkinliğine aracılık etmesiyle (174), tüm organizmalarda ve hücrelerde bulunan günlük süreci etkileme kabiliyeti ile ve uykuyu teşvik etme etkisi (175) ile bilinmektedir. İlk olarak 1917 yılında McCord ve Allen, epifiz bezi özütünün

kurbağa derisinin renginde açılmaya sebep olduğunu ve melanin granüllerinin agregasyona uğradığını belirtmişlerdir (176). Melatonin Lerner ve arkadaşları tarafından 1958 yılında sığır epifiz bezi özütleri ile yapılan çalışmada izole edilmiş, tanımlanmış ve adlandırılmıştır. Bulunan bu molekülün ismi, yani melatonin, deri rengi üzerindeki etkisine dayanmaktadır (“mela” melaninden ve “tonin” ise serotonininden gelmektedir) (177).

Son 60 yıldaki çalışmalar, melatoninin sadece ışığa bağımlı mevsimsel üreme döngüsü olan memelilerde üremeye ilgili nöroendokrin düzenleyici etkisinden çok daha farklı işlevlerinin olduğunu göstermektedir (178). Ayrıca melatoninin epifiz bezi ile tamamen özdeşleştirilmesinin savunulamayacağı gösterilmiştir (179). Filogenetik olarak melatoninin epifiz bezine bağlayan hiçbir şey yoktur. Ayrıca melatonin omurgasızlar ve bitkiler gibi epifiz bezi olmayan, hatta tek hücreliler gibi hiçbir organa sahip olmayan canlılarda bile üretilmektedir (180-182). Bu canlılar omurgalılar gibi antioksidan olarak melatoninine ihtiyaç duymaktadır (182).

Melatonin kan-beyin, kan-testis bariyeri gibi bilinen morfofizyolojik bir bariyer ile engellenmemektedir ve değişmemiş şekilde kolaylıkla plasentayı geçerek cenini etkileyebilmektedir (183).

2.2.1. Melatoninin Fizyolojisi ve Farmakolojisi

Epifiz bezi insanlarda beyinin merkezinde, üçüncü ventrikülün arkasında, mezensefalonun superior kollikulusları arasındaki alanda yer almaktadır. Bu bez iki çeşit hücreden oluşmaktadır. Bunlar pinealositler (epifiz bezi hücresi) ve nöroglial hücrelerdir. Baskın olan pinealositler, daha çok melatonin gibi indolaminleri (bir nörotransmitter ailesi), arjinin (bir tür α -aminoasit) ve vazotosin (oksitosin ve vazopresinin homoloğu) gibi peptidleri üretirler. Epifiz kan akımı açısından böbrekten sonra en fazla kanlanan ikinci organdır (184,185).

Memelilerde epifiz bezi nöroendokrin dönüştürücü olarak görev yapar. Melatonin üretimi karanlık ile artarken, ışık ile azalmaktadır. Gündüz saatlerinde norepinefrin salınımını azaltan retina fotoreseptör hücreleri hiperpolarizedir (186) ve melatonin üretimi azdır. Memeli retinaları ışığa duyarlı retina ganglion hücrelerinin özelleşmiş alt tiplerine sahiptir. Bu hücrelerde ışığa yanıt veren foto pigment, yani

melanopsin, kullanılmaktadır (187,188). Karanlığın başlaması ile bu hücreler norepinefrin salarak sistemi etkinleştirmektedir. Aydınlik ile ilgili mesaj daha sonra optik sinir içindeki retinohipotalamik demet ile hipotalamustaki merkezi biyolojik saate, yani suprakiazmatik çekirdeğe (SCN) aktarılır. SCN epifiz bezine sinirsel sinyal taşıyan önemli bir röle merkezidir (189). SCN' den gelen bu sinirsel mesaj merkezi ve periferik sempatik sinir sistemi yoluyla epifiz bezi içindeki pinealositlere ulaşmaktadır ve epifiz bezi içinde α_1 - ve β_1 - adrenerjik reseptörler artmaktadır. Bu durum epifiz bezini klasik endokrin organlardan ayıran birkaç özelliğten bir tanesidir. Bezin salgı üretimi sinirsel giriş ile yönetilmektedir, zarar görmesi durumunda bez tamamen etkisiz hale gelmektedir (190). Çevresel kaynaklı hormon sinyallerinin düzeltici etkisi melatonin salgılama miktarı ve ritminin ayarlanmasında göz önünde bulundurulmayacak kadar azdır (191).

Melatonin üretiminde triptofan, triptofan hidroksilaz enzimi tarafından 5-hidroksitriptofana (5HTP) dönüştürülür ve dekarboksilasyon ile serotonin oluşur. Serotoninden melatonin oluşturulmasında büyük ölçüde epifiz bezinde sınırlandırılmış iki adet enzim görev almaktadır (192,193). Bunlar N-asetiltransferaz (NAT) ve hidroksiindol-o-metiltransferaz (HIOMT) enzimleridir. Serotonin NAT ile N-asetilserotonine (NAS) dönüşür. NAS' da HIOMT ile melatonine dönüşmektedir.

Omurgalılarda epifiz bezi melatoninini günlük düzende salgılar, en fazla üretim için gece karanlığı gerekmektedir (194). Bu sebeple melatoninden karanlıkta salgılanan kimyasal olarak bahsedilmektedir (195). Melatonin üretimi gecenin ortasında en yüksek düzeye ulaşmakta (saat 02:00-04:00 arasında) ve gecenin ikinci yarısında yavaşça düşmektedir. Melatonin üretimi arttığı zaman pasif difüzyon ile kana geçmektedir. Serum melatonin seviyesi yaşa göre önemli ölçüde değişkenlik göstermektedir. Yeni doğanlarda üç aydan önce çok az seviyede melatonin salgılanmaktadır. Daha sonraki aylarda melatonin artarak günlük düzene girmektedir. Bir ve üç yaşları arasında gece değerleri mililitrede 325 pikogram (pg) ile en yüksek seviyeye ulaşmaktadır ve daha sonra yavaş yavaş düşmektedir. Normal genç erişkinlerde en yüksek gündüz ve gece salınım değeri mililitrede 10 ve 60 pg'dır. Serum melatonin seviyesinin günlük düzeni gece-gündüz döngüsü ile paralel seyretmektedir (196,197). Sürekli karanlıkta tutulan deneklerde 24 saat süresince salgılanma miktarı sabit kalmaktadır (198).

Sıçan hepatosit mitokondrilerindeki melatonin seviyesi, kan melatonin seviyesinden yüksek olduğu ve epifiz bezinin çıkarılmasından sonra kandaki melatonin seviyesi düşerken mitokondrilerdeki melatonin seviyesi azalmadığı bulunmuştur (199). Bu sebele kandaki melatonin seviyesinin tüm vücuttaki melatonin seviyesini temsil ettiğinin düşünülmesi, yanlış bir kanıdır (178). Melatoninin dağılımı farklı olduğu için, kan melatonin seviyesi diğer vücut sıvıları veya hücre içerisindeki melatonin seviyeleri olarak değerlendirilmemelidir (200). Omurgalılarda melatonin üretimi yapan epifiz bezi dışında birçok organ tanımlanmıştır. Fakat bu organların birçoğu (retina hariç) melatonin günlük düzende üretmemekte ve kana vermemektedir. Bu organlar melatonin hücre içi olayları düzenlemek için kullanmaktadırlar (178).

Günlük ritimde üretilen melatonin üzerinde ışık etkisi kısıtlı bir bant genişliğindeki görünür ışıkta, yani 460-480 nanometre (nm) aralığında bir dalga boyundaki mavi ışıkta gerçekleştirilmektedir. epifiz bezinden salgılanan melatoninin azalmasından bu dalga boyları sorumludur (178).

2.2.1.1. Melatoninin Vücuttan Uzaklaştırılması

Melatonin hidroksilasyon (6-hidroksimelatonin) ile karaciğerde hızlı bir şekilde yıkılır ve daha sonra sülfürik asit veya glukuronik asit ile birleştirilerek idrar ile atılır. İdrar ile atılan 6-sulfatoksimeleatonin miktarı (melatoninin esas ara ürünü) serum melatonin seviyesi ile paralellik göstermektedir (197).

2.2.1.2. Melatonin Kullanım Şekli, Dozu ve Zamanı

Melatoninin etkililiğinin belirlenmesinde tedavi dozu ve zamanlaması önemlidir. Tipik olarak insan ve hayvan çalışmalarında zar reseptör aracılı günlük ritmin düzenlenmesinde kullanılan dozlar genellikle zar reseptör bağımlı olmayan serbest radikallerin temizlenmesinde kullanılan dozlardan daha düşüktür. Ayrıca insanlarda uyku gibi günlük süreç üzerindeki etki için kullanıldığında, melatonin akşamları uykudan önce verilmelidir. Tersine serbest radikaller için kullanıldığında, melatonin günün hangi saati olursa olsun serbest radikal oluştuğu anda verildiğinde en etkili olmaktadır (178).

Melatoninin serbest radikal temizleyici özelliğinin sadece farmakolojik miktarlarda verildiğinde gerçekleştiği belirtilmiştir (198). Reiter ve ark, (2014) bu görüşün yanlış olduğunu ifade etmektedir (178). Tek molekül bile olsa herhangi bir radikal temizleyici bir radikalın etkisini yok etme kabiliyetine sahiptir. Fakat şiddetli oksidatif stres altında oluşan fazla sayıdaki serbest radikaller ile mücadelede herhangi bir antioksidanın, üretilen bu zararlı maddeleri etkisiz hale getirebilecek miktarlarda verilmesi gerekmektedir. Serbest radikaller farmakolojik seviyelerde üretildiği için melatoninin de farmakolojik dozlarda verilmesi gerekmektedir (178).

Damar içine uygulanan melatonin hızlı bir şekilde dağılır (serum yarılanma ömrü 0,5-5,6 dakika) ve ortadan kaldırılır (201). Ağızdan alınan melatoninin biyoyararlılığı büyük oranda değişkenlik göstermektedir. Normal deneklere 80 miligram (mg) jelatin kapsül verildiğinde, serum melatonin seviyesini geceleri görülen en yüksek değerden 350-10000 kat daha yüksek seviyeye çıkartmaktadır ve bu değerler 90 dakika boyunca sabit kalmaktadır (202). Eczanelerde ve sağlık ürünleri mağazalarında daha düşük oral dozlar (1-5 mg) yaygın bir şekilde bulunmaktadır. Bu dozlar bir saat içinde serum melatonin seviyesini geceleri görülen en yüksek değerden 10-100 kat daha fazla arttırmaktadır ve bu değer 8 saat içinde taban sınırının altına düşmektedir. Çok düşük oral dozlar (0,1-0,3 mg) en yüksek gündüz melatonin seviyesini geceleri görülen en yüksek değere kadar çıkarmaktadır (203).

Melatonin alınmasına bağlı hiçbir ciddi yan etki veya risk rapor edilmemiştir. Hormonun doza bağlı fizyolojik etkileri (vücut sıcaklığının düşmesi, uykulu halde artış, dikkat kaybı, muhtemel üreme fonksiyonu etkileri), uzun süreli yüksek dozlar alan insanlarda henüz tam olarak değerlendirilmemiştir. Genel olarak belirgin endokrin etkileri olmamasına rağmen, normal deneklerde farmakolojik doz uygulamasının serum luteinize edici hormon (LH) seviyesini azalttığı ve serum prolaktin hormon seviyesini arttırdığı rapor edilmiştir (204,205).

Birçok sentetik melatonin preparatı eczanelerde ve sağlık ürünleri satan mağazalarda bulunmaktadır. Bu ürünlerin saflık durumları hakkında sorunlar mevcuttur. Tüketicilerin saflığından emin oldukları ve Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDI) tarafından onaylanan preparatları satın almaları önerilmektedir (198).

2.2.2. Melatoninin Biyolojik Etkileri

2.2.2.1. Melatonin Reseptörleri

Melatoninin keşfedilmesinden bugüne tüm etkinliğini, belirli hücrelerin zarlarına bağlı olan reseptörler aracılığı ile gerçekleştirdiği kabul edilmiştir (206). Melatoninin üç alt grupta adlandırılmış özel zar ve çekirdek reseptörleri bulunmaktadır. Bunlar ilk olarak Mel-1a, Mel-1b ve Mel-1c olarak adlandırılmıştır (207). Mel-1a reseptörleri hipofiz bezinin tüberal kısmından ve suprakiazmatik çekirdekten (melatoninin sırasıyla üreme ve günlük ritim etkilerinin muhtemel alanları) açığa çıkartılmaktadır. Mel-1b reseptörleri temel olarak retina ve daha az miktarlarda da beyinde bulunmaktadır. Mel-1c memelilerde bulunmamaktadır. Mel-1a ve Mel-1b Uluslararası Temel ve Klinik Farmakoloji Birliği (International Union of Basic and Clinical Pharmacology: IUPHAR) tarafından MT1 ve MT2 olarak adlandırılmıştır (208). Son zamanlarda keşfedilen MT3 reseptörü ise az sayıda hücrenin sitozolünde bulunmaktadır (209).

Melatonin aynı zamanda hücre içi alanlarda da etkilidir. Sitozolik kalmoduline bağlanma sayesinde, yapısal proteinler gibi adenilat siklaz ve fosfodiesteraz gibi hedef enzimler ile etkileşime girerek kalsiyum sinyalizasyonunu direkt etkileyebilmektedir (210).

Çalışmalarda insan beyninin çeşitli bölgelerinde (211), bağırsak (212), yumurtalık (213) ve kan damarlarında (214) melatonin reseptörlerinin varlığını göstermektedir. Sinirsel reseptörler (hipotalamusun suprakiazmatik çekirdeğinde bulunan) günlük ritimleri, sinirsel olmayan reseptörler (hipofiz bezinin tüberal kısmındaki) üreme fonksiyonlarını, çevre dokulardaki reseptörler ise kalp damar fonksiyonları ve vücut sıcaklığını düzenlemektedir (198).

2.2.2.2. Serbest Radikal Temizleme

In-vivo ve in-vitro çalışmalarda melatoninin zararlı hidroksil radikalleri ve oksijen merkezli radikallere karşı etkili bir radikal temizleyici olduğu gösterilmiştir (10,11). Bir çalışmada melatonin bilinen diğer antioksidanlar ile karşılaştırıldığında oksidatif yıkıma karşı korumada daha etkili bulunmuştur (12). Bu

sebeple melatonin dejeneratif ve proliferatif değişikliklere yol açan hastalıklara karşı koruma sağlayabilir.

Melatonin reseptör aracılığı olmadan direkt olarak reaktif oksijen türleri (Reactive oxygen species: ROS) ve reaktif azot türlerini (reactive nitrogen species: RNS) etkisizleştirebilmektedir (215). Diğer klasik radikal temizleyiciler gibi tek elektron aktarımı ve hidrojen aktarımı ile radikalleri yakalayarak etki etmektedir. Fakat henüz tanımlanmamış süreçlerin varlığı söz konusu olabilir (216).

C vitamini gibi bazı radikal temizleyicilerin tersine, evrim boyunca hiçbir organizma melatonin sentezleme yeteneğini kaybetmemiştir, bu da antioksidan olarak melatoninin önemini göstermektedir. Ayrıca iç kökenli üretiminin yanında bitkilerde üretilen melatonin hayvanların bu bitkileri yemesiyle vücuda alınmaktadır (217). Bu ikili kullanım diğer radikal temizleyicilerin aksine melatoninin her zaman kullanılabilir olmasını sağlamaktadır.

2.2.2.3. Bağışıklık Sistemi Etkileri

Melatonin seviyesinde azalmanın meydana geldiği bazı durumlarda bağışıklık sisteminde zayıflama rapor edilmiştir (13). Bazı ilaçların sebep olduğu bağışıklık sistemini baskılayan etkilerin melatonin ile giderildiği bildirilmiştir (218). Melatoninin IL-2 üretimini arttırdığı, IL-2 ve melatoninin bağışıklık sistemini düzenleyici etkisi arasında bir ilişki varlığı gösterilmiştir (219). Melatoninin IL-2 ve IF- γ üretimini artırarak CD4⁺ lenfositleri de aktifleştirmektedir (14). Bu durum melatoninin, CD4⁺ hücrelerinin ve monositlerin etkinleştirilmelerinin düzenlenmesi yolu ile bağışıklık sistemi fonksiyonlarına katıldığını düşündürmektedir (220,221). Melatoninin doğal katil hücrelerinin etkinliğini arttıran IL-2 üretimini yükselttiği göz önünde bulundurulduğunda, kanser ile mücadelede yararlı olabileceği belirtilmektedir (222,223).

2.2.2.4. Uyku ve Günlük Ritim Üzerine Etkileri

İnsanlarda epifiz bezinden salgılanan melatoninin günlük ritmi alışılmış uyku saatleri ile eş zamanlıdır. Zaman kaymasına sebep olan değişimler (uzun uçak yolculukları veya alışılmadık çalışma saatleri) veya körlük durumları uyku

düzensizlikleri ile bağdaşmaktadır. İlk olarak melanin pigment hücrelerinde renk açılmasına sebep olan etken olarak tanımlanan melatoninin insanlarda yatıştırıcı etkisi olduğu belirlenmiştir (224). Uykusuzluk sorunu olan yaşlı bireylerde serum melatonin seviyeleri aynı yaştaki uykusuzluk sorunu olmayan kontrol bireyelerine göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur (225).

Ağız yolu ile alınan melatonin uyku süresi ve kalitesi kadar uyku isteğine (uykuya dalma hızını) de etki etmektedir, aynı zamanda melatonin kullanımının hipnotik etkileri vardır (226). Farklı dozlar ile yapılan birçok çalışmada ağız yoluyla alınan melatoninin uyku isteğini arttırdığı, hızlı-göz-hareketi (REM) uykusu süresini uzattığı (226), uyku bozukluğu olan hastalarda uyku kalitesi ve süresini uzattığı gösterilmiştir (227).

Melatonin salgılanmasındaki faz atlaması zaman dilimi değişikliği olan uçak yolcularında, gece vardiyasında çalışan işçilerde ve gecikmiş uyku evresi sendromu (geç uyuma ve geç uyanma) olan hastalarda meydana gelmektedir. Sabit aydınlatma altında tutulan denekler ve bazı kör denekler 25 saatlik melatonin döngüsüne sahiptir (228).

Parlak ışık ve melatonin kullanımı, melatoninin normal günlük ritmini değiştirmektedir, fakat bu etkiler ile ilgili bilgiler tutarsızdır, bu durum muhtemelen parlak ışığa maruz kalma zamanlaması ve melatonin kullanımının gece gündüz döngüsü ile ilişkisinden kaynaklanmaktadır. Denekler sabahları parlak ışığa maruz bırakıldığında, gece melatonin salgılanması erken başlarken denekler akşamları parlak ışığa maruz bırakıldığında gece melatonin salgılanması gecikmektedir (229).

2.2.2.5. Cinsel Olgunluk ve Üreme Üzerine Etkileri

Epifiz bezinin melatonin salgılaması ile birçok türün üreme performansını etkilediğine dair çok sayıda kanıt vardır. Dışarıdan alınan melatoninin özellikle üreme fonksiyonlarını düzenleme etkisinde türler arasında belirgin farklılıklar vardır. Bu farklılıklar yaş ve aydınlık-karanlık döngüsü veya östrus döngüsü ile ilişkili melatonin kullanım zamanlamasına bağlı olarak görülmektedir. Bazı türlerde melatoninin antigonadotropik etkileri vardır. Gün içinde karanlık saat sayısı ve buna bağlı melatonin salgılanma saatlerindeki değişim üreme faaliyeti ve üreme dönemleri

arasındaki bağlantıya aracılık etmektedir. Örneğin farelerde uzun karanlık dönemi üreme fonksiyonunu önlemektedir, fazla melatonin salgılandığında erkeklerde testis ile ilgili gerilemeye ve dişilerde anöstrusa yol açmaktadır (230).

2.2.2.6. Yaşlanma Üzerine Etkileri

Yaşlanma ile birlikte meydana gelen gece serum melatonin seviyelerindeki azalma ve buna bağlı birçok biyolojik etki, araştırmacıların yaşlanma ve yaşlanmaya bağlı hastalıklarda melatoninin rolü olduğunu öne sürmelerine sebep olmuştur (231,232). Rat ve fare çalışmaları (233,234) melatonin salgılanmasındaki azalmanın yaşlanma sürecindeki hızlanma ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Aşırı serbest radikal üretimi yıkıcıdır ve hücre ölümü veya nekroza sebep olan büyük oksidatif hasar, ikincil hücreleri öldürmektedir. Programlanmış hücre ölümü sebebiyle hücrelerin kaybedilmesi birçok hastalıkla birlikte yaşa bağlı yıpranmalara sebep olmaktadır ve/veya katkıda bulunmaktadır. Yaşlanma hücresel süreçlerin fonksiyon kaybına sebep olan oksidatif atıkların birikimi ile ilişkilidir ve bu sebeple daha fazla serbest radikal oluşumu tetiklenmektedir. Böylece yaşlanma bir kısır döngü haline gelmektedir. Moleküler süreç zayıfladığında ilave fizyolojik çöküşe yol açan oksidatif hasar birikmektedir. Serbest radikalleri etkisiz hale getirebilme özelliğinden dolayı melatonin çeşitli organlarda yaşlanma ile ortaya çıkan işlev bozukluklarını geciktirmektedir (17). Melatonin, serbest radikallerin yol açtığı hücre hasarının etkilerinin azaltarak veya bağışıklık sistemini güçlendirerek yaşlanmaya karşı koruma sağlamaktadır. Artan yaş melatonin üretiminin kademeli olarak azalmasına sebep olmaktadır, yaşlılarda geceleri dolaşımdaki melatonin artışı büyük oranda azalmaktadır veya ortadan kalkmaktadır. Bu azalmanın sonuçları sağlık açısından son derece önemlidir (235). Ayrıca yaşlanma ile melatonindeki azalma nörodejeneratif hastalıklar (236), kardiyovasküler hastalıklar (237), cildin bozulması (238) ve metabolik hastalık tablosu (239) gibi serbest radikale sebep olan hastalıkların ilerlemesine katkıda bulunmaktadır. Deneysel çalışmalarda yaşlı hayvanlarda melatonin bu değişimlerin bazılarını geciktirmiştir (17). Fakat yaşa bağlı melatonin salgılanmasındaki azalma yaşlanma sebebinden ziyade yaşlanma sürecinin bir parçası olabilir (198).

2.2.2.7. Kanser Üzerine Etkileri

Melatonin akciğer, böbrek, prostat, mide ve bağırsak gibi belirli kanserlerin tedavisinde kullanılan anti-neoplastik bir ajan olarak bilinmektedir (240,241). Deneysel hayvan çalışmalarında melatoninin tümörler üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir. Epifiz bezinin çıkartılması tümör gelişimini arttırmaktadır ve melatonin uygulaması bu etkiyi tersine çevirerek tümör gelişimini durdurmaktadır (15). Östrojen-reseptör-pozitif meme kanseri olan kadınlarda ve prostat kanserli erkeklerde serum melatonin seviyeleri ve idrar melatonin ara ürünü seviyeleri düşüktür (242,243). Melatoninin tümör metastazlarını sınırladığı (16) gibi birçok kanser hücresinin çoğalmasını da durdurmaktadır (244). Melatoninin kanser hücrelerinin bölünmesi ve metastazı ile ilişkili moleküler süreçleri engelleme kabiliyeti klasik zar reseptörleri ile olmaktadır. Kanser hücrelerinin apoptozunu teşvik etme yeteneği ise reseptörlerden bağımsız olan antioksidatif işlevleri ile açıklanmaktadır. Melatoninin kanser hücrelerinde apoptoz başlatması ile normal hücrelerdeki apoptozu önlemesi tam olarak açıklanamamaktadır (245).

2.2.2.8. Melatonin ve Kemik

Melatonin kemik oluşumunu ve osteoblast farklılaşmasını arttırmaktadır (19). Melatoninin *in vitro* şartlarda insan osteoblastlarında tip I kollajen sentezini uyardığı gösterilmiştir (18). Ayrıca melatonin kemik siyaloprotein yapımını ve preosteoblastlarda osteokalsin, osteopontin, alkalın fosfataz gibi kemiğe ait diğer protein belirteçlerini arttırmakta, osteoblast farklılaşma süresini 21 günden (normal olan) 12 güne düşürmektedir (246). Kemik rezorbsiyonunda görevli olan osteoklastlar, melatonin için diğer muhtemel hedef hücrelerdir. Enflamatuvar şartlarda meydana gelen kemik yıkımında oksijen türevi serbest radikaller önemli rol oynamaktadır. Kronik enflamatuvar hastalıklarda serbest radikaller osteoklastların uyarılması hatta direkt olarak matriks yıkımının artmasından sorumlu olabilir. Melatonin dolaylı antioksidan etkisi ve direkt serbest radikal temizleme etkisi yoluyla osteoklastların etkinliğini geciktirerek kemik yıkımını azaltmaktadır (20,21).

Melatonin kemik rezorbsiyonunu baskılayarak kemik kütlesinin artmasını sağlamaktadır. Doza bağlı olarak kemik iliği hücrelerinden türeyen osteoklastların

oluşturduğu rezorpsiyon alanlarını ve sayısını azaltmaktadır. Melatoninin farelerde RANKL aracılı osteoklast oluşumu ve aktivasyonu ile kemik rezorpsiyonunu engellediği ve kemik kütlesini arttırdığı bildirilmiştir (142,247). Bir çalışmada melatoninin doza bağlı olarak osteoklast sayısı, osteoklast yüzeyi/kemik yüzeyi oranını belirgin bir şekilde azalttığı gösterilmiştir (21).

2.2.3. Diş Hekimliğinde Melatonin

Diş hekimliğinde melatonin ve biyolojik etkilerinin değerlendirildiği sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Melatonin diş germelerindeki odontojenik hücrelerin düzenlenmesi yolu ile fizyolojik diş gelişiminde rol oynadığı bildirilmiştir (248). Hamsterlarda melatonin salgılanmasındaki sezonluk değişim, çürük oluşumu ile ilişkili bulunmuştur (249).

Melatoninin kanser hücrelerinin hareketliliğini moleküler mekanizmalar ile azalttığı in vitro olarak gösterilmiştir (250). Melatonin reseptör tip 1A (MTNR1A) gen polimorfizminin yüksek oral kanser riski ile ilişkili olduğu bulunmuştur (251). MTNR1A eksikliğini tedavisi oral squamöz hücreli karsinom hücrelerinin büyümesini engellemektedir (252). Melatoninin ROS' ları azaltarak lökoplaki ve liken planus gibi prekanseröz lezyonlara karşı etkili olabileceği bildirilmiştir (252).

Melatoninin sağlıklı veya diabetik ratlarda oksidatif stresi, osteoklastik aktiviteyi ve alveoler kemik kaybını azalttığı bildirilmiştir (253-255). Periodontitisli ve Tip 1 veya Tip 2 diabetli bireylerde, topikal melatonin uygulamasının serum C-reaktif protein (CRP), IL-6 değerleri ile cep derinliği ve gingival indeksi azalttığı (256), salya RANKL, asit fosfataz, alkalın fosfataz, osteokalsin ve osteopontin seviyelerini düşürdüğü ve salya OPG seviyelerini ise yükselttiği bildirilmiştir (257,258). Ratlarda deneysel periodontitis modelinde sistemik olarak uygulanan melatoninin reaktif oksijen türlerini azalttığı, SOD ve GSH-PX gibi antioksidan enzimlerin serumdaki seviyelerini arttırdığı bildirilmiştir (259). Tip 2 diabetli ve periodontitisli hastalarda serum melatonin seviyeleri sağlıklı hastalara göre düşük bulunmuştur (260). Kronik veya agresif periodontitisli bireylerde dişeti oluşu sıvısı ve salya melatonin seviyeleri sağlıklı bireylere göre daha düşük bulunmuştur (261). Periodontitisli bireylerde plazma ve salya melatonin seviyeleri

sağlıklı bireylere göre düşük bulunmuştur (262). Melatoninin, osteoblastları klorheksidin hasarına karşı koruyarak periodontitis ve peri-implantitis tedavisinde ümit vaat eden bir ilaç olduğu bildirilmiştir (263). Kemik iliği ve periodontal ligament mezenşim hücrelerinde zoledronik asite (bifosfonat) karşı koruyucu etkisi *in-vitro* olarak gösterilmiştir (264). İmmEDIATE dental implantlarda biomimetik ajan olarak lokal melatonin uygulamasının minimal kemik yıkımına yol açtığı ve implant stabilitesini arttırdığı bildirilmiştir (265). Çekim soketine lokal melatonin uygulanmasının radyografik olarak kemik densitesine anlamlı bir etki yapmadığı bildirilmiştir (266). Melatoninin lokal uygulamasının diş çekimine bağlı oksidatif stres artışını geri çevirdiği bildirilmiştir (267).

Tavşanlarda, melatonin ile kaplanmış titanyum ve zirkon implantların 1 hafta sonunda kemik-implant bağlantı (BIC) değerlerini arttırdığı (268), kemik defektlerine uygulanan melatonin greftlerinin yeni kemik yapımı ve anjiyogenezi arttırdığı (269,270), implant alanına lokal olarak uygulanan melatoninin osteointegrasyonu arttırdığı (271) bildirilmiştir. Köpeklerde, implant yuvalarına lokal olarak uygulanan melatoninin implant çevresindeki kemik yoğunluğunu, yivler arası kemik miktarını arttırdığı ve melatonin uygulamasının kemik içi dental implantlarda biyomimetik etki gösterdiği bildirilmiştir (272,273).

Melatoninin *in-vitro* olarak rat dental papilla hücrelerinin farklılaşmasını uyardığı ve çoğalmasını baskıladığı ayrıca *in-vivo* olarak dentin oluşumunu azalttığı bildirilmiştir (274). Literatürde endodonti alanında melatonin ile ilgili bir adet çalışma bulunmuştur. Li ve ark, (2015) sistemik olarak verilen melatoninin histolojik olarak pulpada meydana gelen hasarı düzelttiğini ve nekrozu azalttığını bildirilmişlerdir (275).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

“Melatoninin deneysel periapikal lezyon üzerine etkisi” başlıklı tez çalışmasını gerçekleştirmek için gerekli olan “Deney Hayvanları Uygulama Sertifikası” programına katılım sonrası bu alanda uygulama yeterlilik belgesi temin edildi (SDÜ HADYEK No:2012-2/010)

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi, Farmakoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 05 Haziran 2014 tarih ve 01 sayılı kararı ile uygun görülen çalışma, Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından 4076-D1-14 proje numarası ile desteklenmiştir.

3.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada 30 adet 282-399 gr ağırlığında erişkin Sprague-Dawley cinsi erkek rat kullanıldı. Ratlar Süleyman Demirel Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Deney hayvanlarının tümü 21-23° C sabit ortam sıcaklığında, %55-60 nem sağlanan, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık olacak şekilde, yem ve su kısıtlamasının olmadığı, her kafeste 5 hayvan olacak şekilde, Euro type-IV kafesler içerisinde deney süresince Süleyman Demirel Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi Laboratuvarı'nda barındırıldı. Deney hayvanları %21 protein içeren hazır standart pelet yem ile bazal miktarda beslendi (ad libitum) ve içme suyu olarak şehir şebeke suyu verildi.

30 adet yetişkin erkek ratın alt çene sağ ve sol toplam 60 adet 1. büyük azı dişi seçildi, hayvanların canlı ağırlıkları ölçülerek kuyruk kısımlarından numaralandırıldı ve anestezi dozları hesaplandı (Tablo 1).

Deney hayvanlarına anestezi için periton içine (intraperitoneal:IP) enjekte edilen %10 Ketamin (Brema %10, Bremer Pharma GmbH, Almanya) / %2 Xylazin (Xylazin Bio 2%, Bioveta, Çek Cumhuriyeti) uygulandı (resim 3) ve anestezi derinliği parmak sıkıştırma testi ile kontrol edildi (resim 4). Anesteziyi takiben ratların ağız içleri ile alt azı dişleri iyodin solüsyonu ile dezenfekte edildi. Çalışma alanında kullanılacak aletler daha önceden otoklavda steril edildi.

Tablo 1. Ratların deney süresince ölçülen ağırlıkları ve ağırlıklara göre hesaplanan anestezi, etanol ve melatonin dozları.

Ratlar		Negatif Kontrol				Pozitif Kontrol				Melatonin			
		0. Gün	1-10 Gün	11-20 Gün	21. Gün	0. Gün	1-10 Gün	11-20 Gün	21. Gün	0. Gün	1-10 Gün	11-20 Gün	21. Gün
1	Ağırlık (gr)	333	333	349	355	333	333	334	337	310	310	300	300
	Ketamin/ Xylazine (mg)	33,3 3,33	-	-	35,5 3,55	33,3 3,3	-	-	33,7 3,37	31 3,1	-	-	30 3
	Etanol (ml)	0,33	0,33	0,35	-	0,33	0,33	0,33	-	0,31	0,31	0,3	-
	Melatonin (mg)	-	-	-	-	-	-	-	-	3,1	3,1	3	-
2	Ağırlık (gr)	345	345	350	351	328	328	313	310	351	351	352	350
	Ketamin/ Xylazine (mg)		-	-	-	32,8 3,28	-	-	31 3,1	35,1 3,51	-	-	35 3,5
	Etanol (ml)	0,35	0,35	0,35	-	0,33	0,33	0,31	-	0,35	0,35	0,35	-
	Melatonin (mg)	-	-	-	-	-	-	-	-	3,51	3,51	3,52	-
3	Ağırlık (gr)	296	296	309	312	344	344	322	318	349	349	346	348
	Ketamin/ Xylazine (mg)	29,6 2,96	-	-	31,2 3,12	34,4 3,44	-	-	31,8 3,18	34,9 3,49	-	-	34,8 3,48
	Etanol (ml)	0,3	0,3	0,31	-	0,34	0,34	0,32	-	0,35	0,35	0,35	-
	Melatonin (mg)	-	-	-	-	-	-	-	-	3,49	3,49	3,46	-
4	Ağırlık (gr)	335	335	330	328	328	328	305	307	399	399	393	396
	Ketamin/ Xylazine (mg)	33,5 3,35	-	-	32,8 3,28	32,8 3,28	-	-	30,7 3,07	39,9 3,99	-	-	39,6 3,96
	Etanol (ml)	0,34	0,34	0,33	-	0,33	0,33	0,31	-	0,4	0,4	0,39	-
	Melatonin (mg)	-	-	-	-	-	-	-	-	3,99	3,99	3,93	-
5	Ağırlık (gr)	325	325	325	324	341	341	329	320	337	337	330	332
	Ketamin/ Xylazine (mg)	32,5 3,25	-	-	32,4 3,24	34,1 3,41	-	-	32 3,2	33,7 3,37	-	-	33,2 3,32
	Etanol (ml)	0,33	0,33	0,33	-	0,34	0,34	0,33	-	0,35	0,34	0,33	-
	Melatonin (mg)	-	-	-	-	-	-	-	-	3,37	3,37	3,3	-
6	Ağırlık (gr)	282	282	272	270	322	322	312	309	279	279	304	311
	Ketamin/ Xylazine (mg)	28,2 2,82	-	-	27 2,7		-	-	30,9 3,09	27,9 2,79	-	-	31,1 3,11
	Etanol (ml)	0,28	0,28	0,27	-	0,32	0,32	0,31	-	0,28	0,28	0,3	-
	Melatonin (mg)	-	-	-	-	-	-	-	-	2,79	2,79	3,04	-
7	Ağırlık (gr)	306	306	279	268	374	374	343	339	385	385	381	382
	Ketamin/ Xylazine (mg)	306 306	-	-	268 268	374 374	-	-	339 339	385 385	-	-	382 382
	Etanol (ml)	0,31	0,31	0,28	-	0,37	0,37	0,34	-	0,39	0,39	0,39	-
	Melatonin (mg)	-	-	-	-	-	-	-	-	3,85	3,85	3,81	-
8	Ağırlık (gr)	311	311	301	295	304	304	290	289	278	278	230	210
	Ketamin/ Xylazine (mg)	31,1 3,11	-	-	29,5 2,95	30,4 3,04	-	-	28,9 2,89	27,8 2,78	-	-	21 2,1
	Etanol (ml)	0,31	0,31	0,3	-	0,3	0,3	0,29	-	0,28	0,28	0,23	-
	Melatonin (mg)	-	-	-	-	-	-	-	-	2,78	2,78	2,3	-
9	Ağırlık (gr)	311	311	287	280	333	333	313	300	352	352	357	355
	Ketamin/ Xylazine (mg)	31,1 3,11	-	-	28 2,8	33,3 3,33	-	-	30 3,0	35,2 3,52	-	-	35,5 3,55
	Etanol (ml)	0,31	0,31	0,29	-	0,33	0,33	0,31	-	0,35	0,35	0,36	-
	Melatonin (mg)	-	-	-	-	-	-	-	-	3,52	3,52	3,57	-
10	Ağırlık (gr)	316	316	290	284	308	308	303	299	301	301	296	293
	Ketamin/ Xylazine (mg)	31,6 3,16	-	-	28,4 2,84	30,8 3,08	-	-	29,9 2,99	30,1 3,01	-	-	29,3 2,93
	Etanol (ml)	0,32	0,32	0,29	-	0,31	0,31	0,3	-	0,3	0,3	0,3	-
	Melatonin (mg)	-	-	-	-	-	-	-	-	3,01	3,01	2,96	-



Resim 3. Periton içi (IP) anestezi uygulaması.



Resim 4. Parmak sıkıştırma testi ile anestezi kontrolü.

3.2. Deney Grupları

Ratların ağız açıklıklarının, diş boyutlarının, çalışma pozisyonunun, manipulasyon yeterliliğinin laboratuvar şartlarında test edilebilmesi ve periapikal lezyon oluşumunun radyografik olarak değerlendirilebilmesi amacıyla Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul'un 05.06.2014 tarih ve 01 sayılı kararı ile bir ön çalışma yapıldı. Ön çalışmada 2 adet ratın alt 1. azı dişlerinin pulpaları ekspoz edildi. Ratlar 21. günde sakrifiye edilerek radyografik olarak değerlendirildi. Bu ön çalışma sonucunda ratların azı dişlerinde pulpa ekspozlarının uygulanabilirliği, konumu, derinliği ve 21. günün periapikal lezyon oluşumu açısından yeterliliği ve buna bağlı olarak ratların sakrifiye edilme zamanları belirlendi.

Deney hayvanları (N=30) her grupta 10 adet olmak üzere rastgele 3 gruba ayrıldı (tablo 2).

Negatif kontrol grubu (n=10): Rat dişlerine herhangi bir işlem uygulanmadı, deney süresince her gün bir doz IP etanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD) uygulandı.

Pozitif kontrol grubu (n=10): Rat alt sağ ve sol 1. azı dişlerinde pulpa ekspoza oluşturularak periapikal lezyon oluşumu indüklendi ve deney süresince her gün bir doz IP etanol uygulandı.

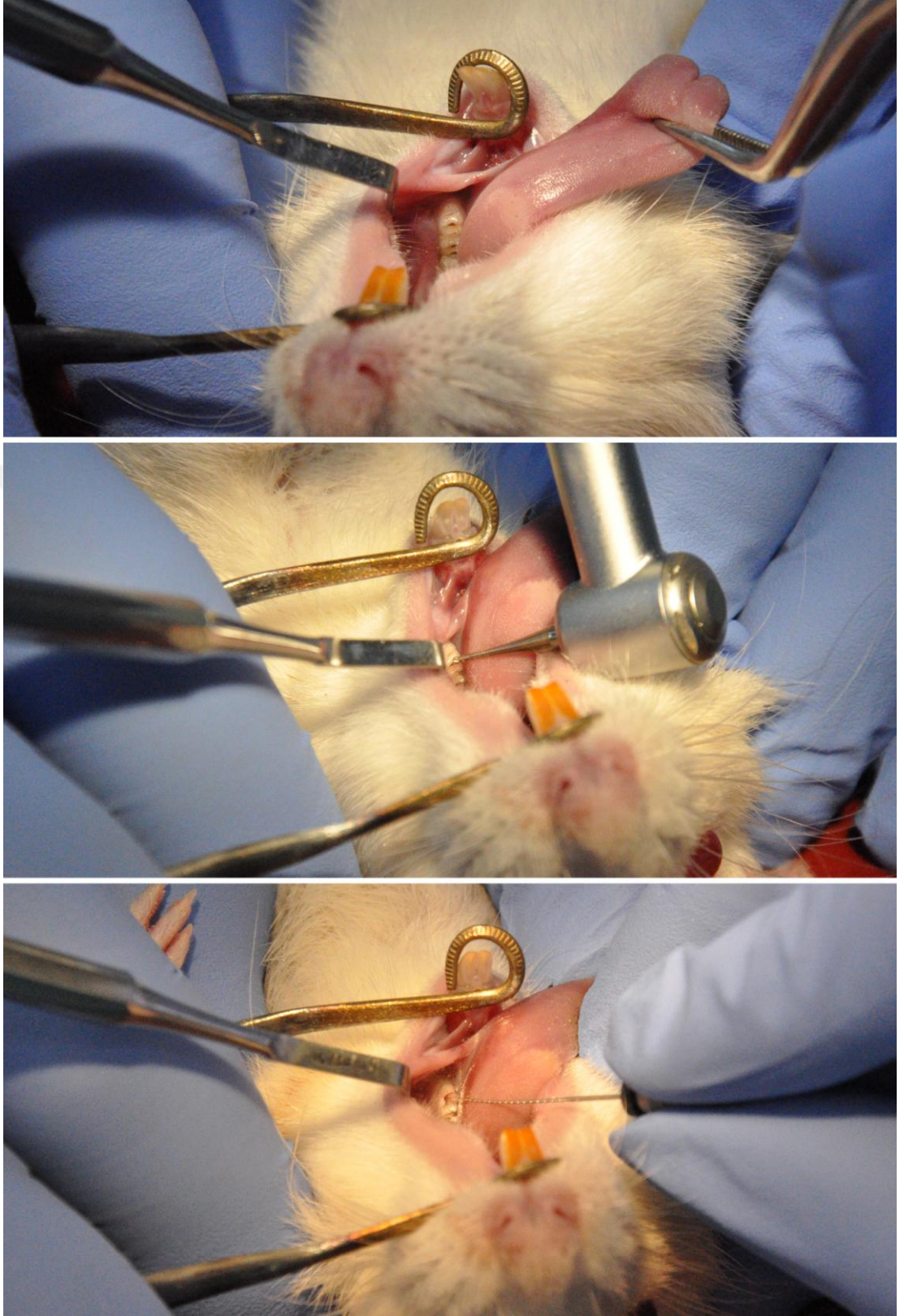
Melatonin grubu (n=10): Rat alt sağ ve sol 1. azı dişlerinde pulpa ekspoza oluşturularak periapikal lezyon oluşumu indüklendi ve deney süresince her gün bir doz IP melatonin (M5250-1G: Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD) uygulandı.

Tablo 2. Deney grupları ve deney protokolü.

Deney Grupları	Periapikal lezyon oluşumunun indüklenmesi	Uygulanan İlaç	Doz	Süre
Negatif kontrol n=10	Yok	Etanol	1 ml/kg (%10'luk)	21gün
Pozitif kontrol n=10	Var	Etanol	1 ml/kg (%10'luk)	21gün
Melatonin n=10	Var	Melatonin/ Etanol	10 mg/kg 1 ml/kg (%10'luk)	21 gün

3.3. Deneysel Periapikal Lezyon Oluşturulması

Pozitif kontrol ve melatonin gruplarındaki 20 adet ratın alt sağ ve sol 1. büyük azı dişlerinin pulpalari, serum fizyolojik soğutmalı düşük devirli döner alete (35.000 devir/dk) takılan ISO 010 ve 006 (NTI, Kahla, Almanya) çelik rond frezler ile okluzal yüzeylerde sınıf I kaviteler hazırlanarak ekspoze edildi. Kök kanallarının açıklığı 10 numaralı K eğesi (Thomas, Bourges, Fransa) ile kontrol edildi. Periapikal lezyon oluşumu için okluzal kaviteler 21 gün boyunca ağız boşluğuna açık bırakıldı (resim 5).








Resim 5. Periapikal lezyon oluşunun indüklenmesi amacı ile alt birinci büyükazı dişinin pulpasının ekspoze edilmesi.

3.4. Melatonin ve Etanol Solüsyonlarının Hazırlanması ve Uygulanması

Melatonin, 3,5 ml %10'luk etanol içerisinde 35 mg olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan bu solüsyon melatonin grubundaki ratların ağırlıklarına göre (10mg/kg) 21 gün boyunca her gün öğle saatlerinde (13.30-14.00) tek doz IP olarak verildi (tablo 3). Uygulama solüsyonu günlük olarak hazırlandı ve bekletilmeden uygulandı. IP uygulamalar 0.45 x 13 mm iğneye sahip insülin enjektörleri (Hayat Tıbbi Aletler, İstanbul, Türkiye) kullanılarak yapıldı.

Negatif ve pozitif kontrol gruplarındaki ratlara ise 21 gün süreyle deney grubundaki hayvanlara verilen melatonin, etanol, distile su çözeltisindeki etanol ile eşdeğer hacimde % 10'luk IP etanol uygulandı.

Tablo 3. Deney süreci.

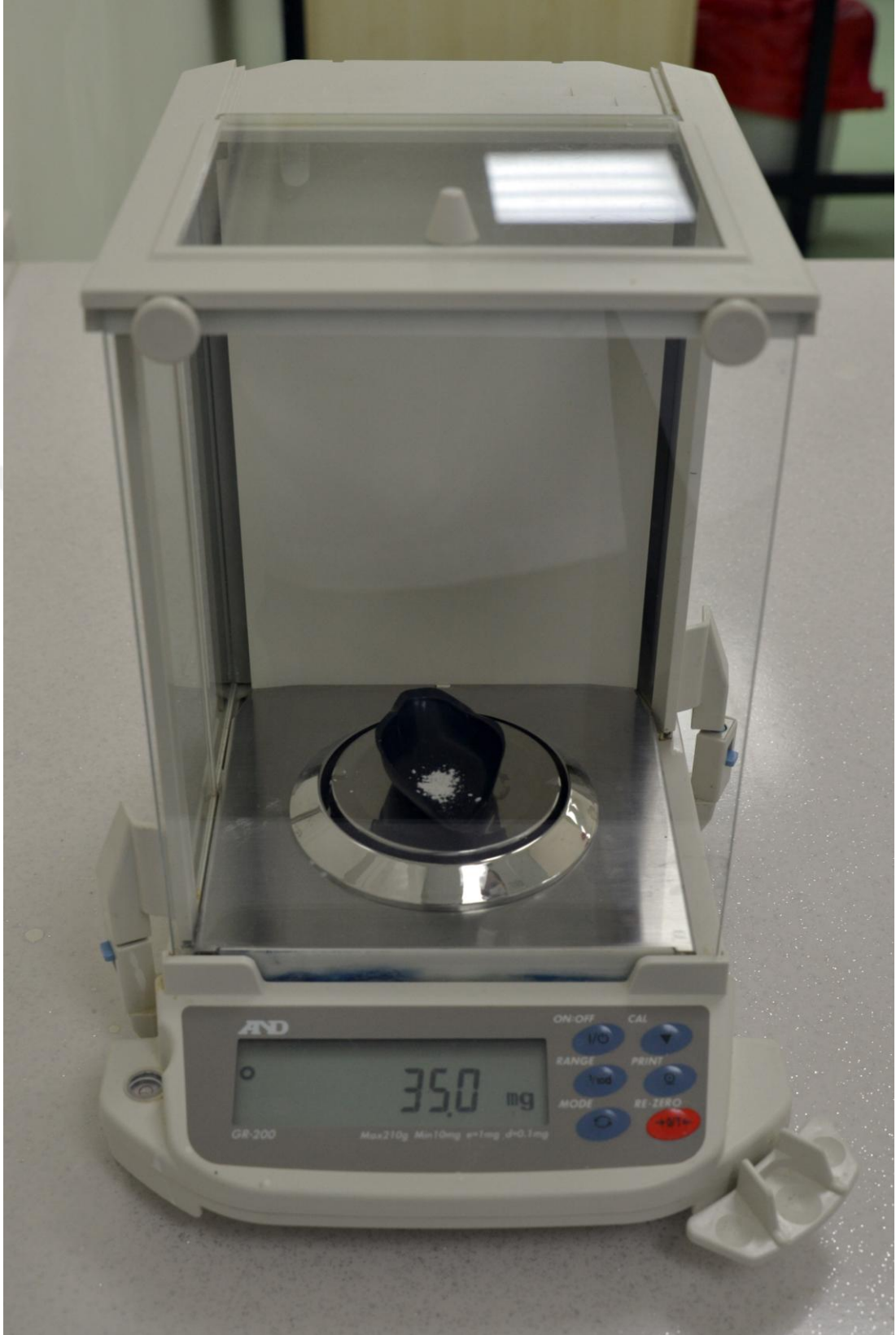
Negatif Kontrol	Pozitif Kontrol	Deney
0. GÜN		
Ağırlık ölçümü ve IP %10'luk etanol (1ml/kg)	Ağırlık ölçümü, periapikal lezyon indüksiyonu ve IP %10'luk etanol (1ml/kg)	Ağırlık ölçümü, periapikal lezyon indüksiyonu ve IP melatonin (10mg/kg)
		
1. GÜN		
IP %10'luk etanol (1ml/kg)	IP %10'luk etanol (1ml/kg)	IP melatonin (10mg/kg)
		
2-10. GÜNLER		
IP %10'luk etanol (1ml/kg)	IP %10'luk etanol (1ml/kg)	IP melatonin (10mg/kg)
		
11. GÜN		
Ağırlık ölçümü ve IP %10'luk etanol (1ml/kg)	Ağırlık ölçümü ve IP %10'luk etanol (1ml/kg)	Ağırlık ölçümü ve IP melatonin (10mg/kg)
		
12-20. GÜNLER		
IP %10'luk etanol (1ml/kg)	IP %10'luk etanol (1ml/kg)	IP melatonin (10mg/kg)
		
21. GÜN		
Ağırlık ölçümü	Ağırlık ölçümü	Ağırlık ölçümü
Hayvanların ötenazisi ve çene örneklerinin alınması	Hayvanların ötenazisi ve çene örneklerinin alınması	Hayvanların ötenazisi ve çene örneklerinin alınması

3.4.1. Melatonin Solüsyonunun Hazırlanması ve Doz Ayarlaması

- Toz halindeki saf melatoninden (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD) hassas terazide (GR-200, A&D Company, Tokyo, Japonya) 35 mg tartıldı (resim 6,7)
- Melatonin deney tüpüne aktarıldı.
- Tüpün içerisine mikro pipet (ISOLAB Laborgeräte GmbH, Wertheim, Almanya) ile ölçülen 0.35 ml saf etanol (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD) eklendi (resim 8).
- Vorteks cihazında (Zx³ Velp Scientifica, Usmate (MI), İtalya) melatonin etanol içerisinde çözünene kadar karıştırıldı (resim 9).
- Tüpün içine 3,15 ml distile su ilave edildi.
- Tüp tekrar vorteks cihazına alınarak karıştırıldı.
- 1 ml hacimde 10 mg melatonin içeren 3,5 ml solüsyon elde edildi.
- Tüpün ağzı hava geçirmemesi için parafin film ile sıkıca kapatıldı.
- Her deney hayvanı tek tek tartılarak uygulanması gereken solüsyon miktarı hesaplandı. Örneğin; 345 gr ağırlığa sahip bir hayvana melatonin çözeltisinden 0,345 ml uygulandı. Böylece her hayvana tam olarak 10 mg/kg melatonin verilmiş oldu.
- Hazırlanan solüsyon 15 dakika içinde deney hayvanlarına uygulandı (resim 10).



Resim 6. Melatonin.



Resim 7. Melatoninin hassas terazide tartılması.



Resim 8. Mikropipet ile etanol ve distile su ölçümü.



Resim 9. Vorteks cihazı ile melatoninin etanol içerisinde çözdürülmesi.



Resim 10. IP melatonin veya etanol uygulaması.

3.4.2. Etanol Solüsyonunun Hazırlanması ve Doz Ayarlaması

- Beher kabı içinde saf etanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD) 1/10 oranında distile su ile karıştırılarak %10'luk etanol solüsyonu elde edildi.
- Kabin ağzı parafin film ile sıkıca kapatıldı.
- Her deney hayvanı tek tek tartılarak uygulanması gereken solüsyon miktarı hesaplandı. Örneğin; 313 gr ağırlığa sahip bir hayvana etanol çözeltisinden 0,313 ml uygulandı.

3.5. Hayvanların Ötenazisi

Yirmi bir gün sonunda hayvanlar %10'luk Ketamin ve %2'lik Xylazin anesteziyi takiben sakrifiye edildi. Ötenazi yöntemi olarak cerrahi kanatma (egzanguinasyon) tekniği kullanıldı. Sağ ve sol 1. büyükazı dişleri ile beraber sağ ve sol alt çene kemikleri kafatasından ayrıldı ve çevre yumuşak doku artıkları temizlendi (resim 11). Örnekler daha önceden hazırlanan numaralandırılmış, % 10'luk formaldehid (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD) içeren steril kaplara yerleştirildi (resim 12).



Resim 11. Yumuşak dokular temizlenmiş rat sağ ve sol alt çeneleri.



Resim 12. Formaldehit içeren numaralandırılmış kaplara yerleştirilen alt çene örnekleri.

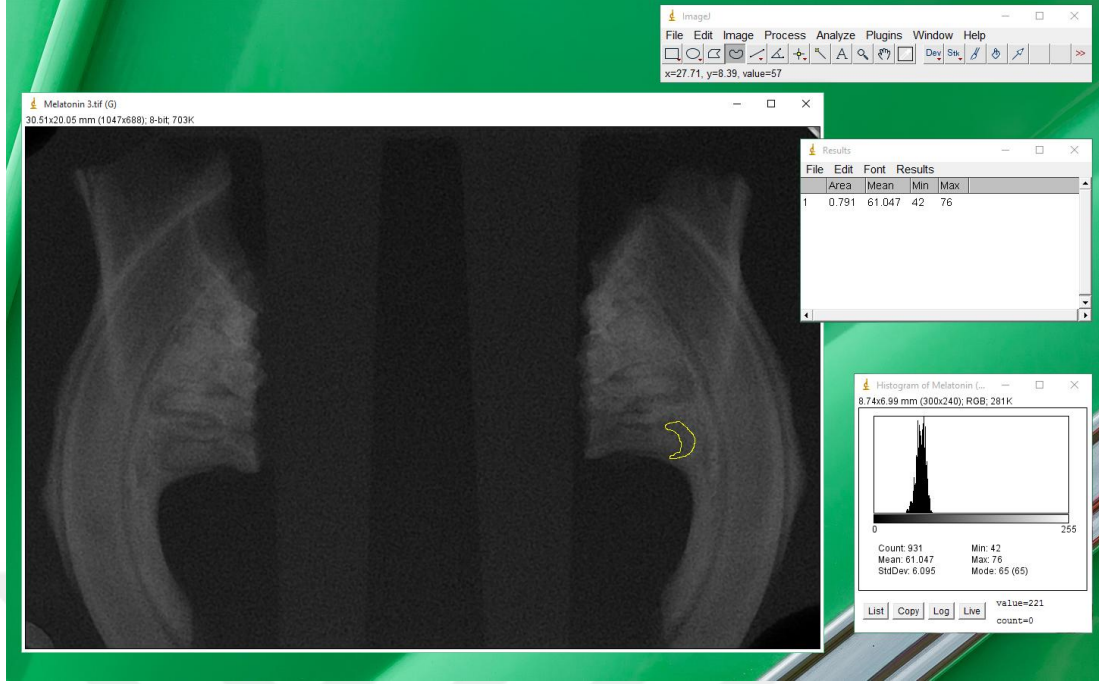
3.6. Radyografik İnceleme

Sağ ve sol alt 1. büyük azı dişlerin periapikal bölgelerinin radyografik olarak değerlendirilmesi amacıyla, aktif alanı 1050x690 piksel olan dijital sensör (ProSensor, Planmeca OY, Helsinki, Finlandiya) ve 70 Kvp, 7 mA, 0.12 saniye ekspoz süresine ayarlı röntgen cihazı (INTRA, Planmeca OY, Helsinki, Finlandiya) kullanılarak periapikal dijital radyografiler alındı. Tüm örneklerden aynı açı ve aynı uzaklıktan standart radyografiler alınabilmesi için sabit bir düzenek hazırlandı (resim 13).

Dijital görüntüler Image J (version 1.48, National Institute of Health, ABD) görüntü analiz programına aktarıldı. Program, uzunluğu (mm) ve piksel değeri bilinen bir skala yardımı ile kalibre edildi. Meziyal kök ile ilişkili periapikal lezyon sınırları programdaki serbest çizim aracı ile belirlendi, program tarafından otomatik olarak hesaplanan lezyon alanı (mm²) ve piksel değerleri kaydedildi (resim 14). Negatif kontrol grubuna ait tüm örneklerde, meziyal kökün periapikal bölgesinde 0,216 mm² çapında standart bir alan seçilerek piksel değerleri kaydedildi.



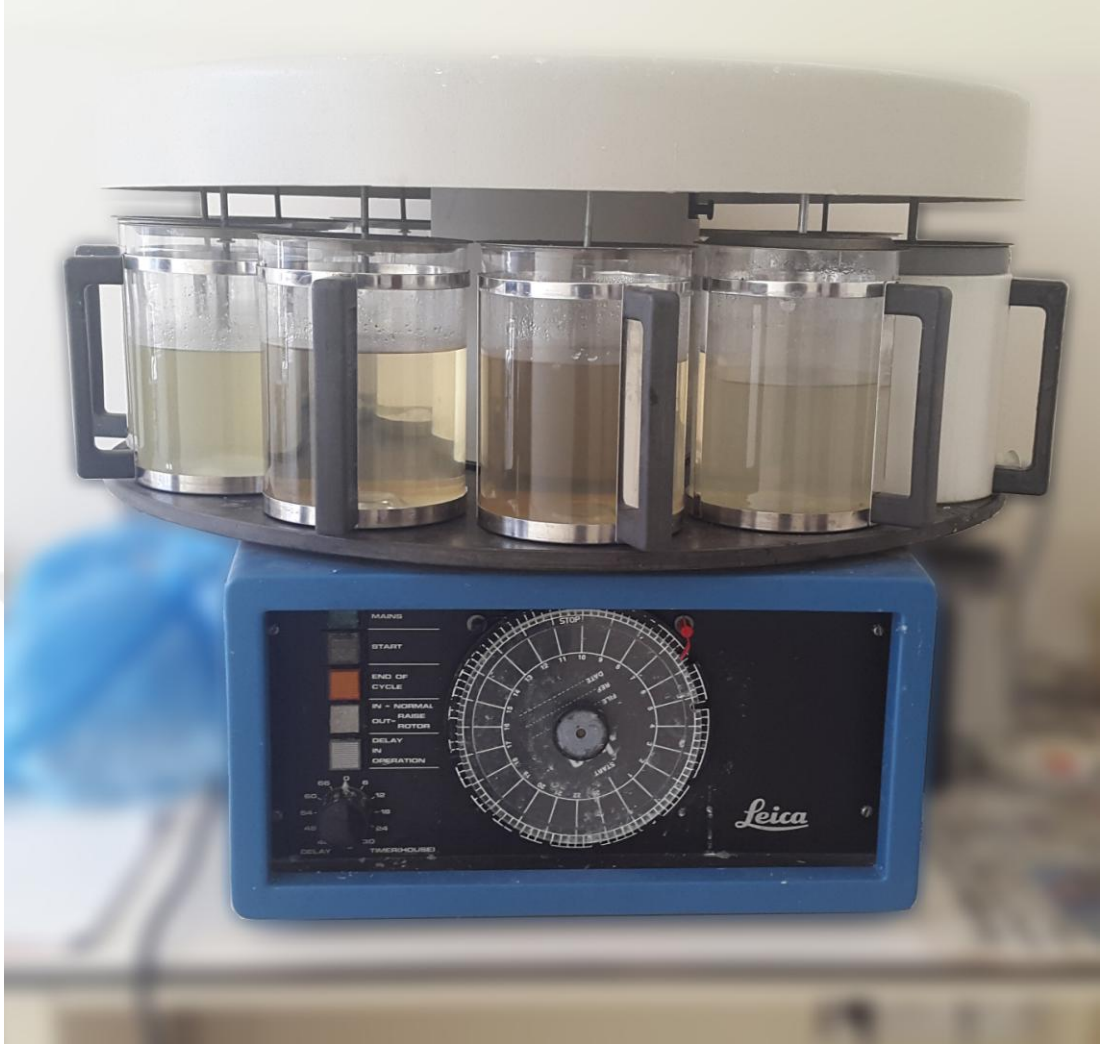
Resim 13. Standart radyografi alınabilmesi için hazırlanan düzenek.



Resim 14. Periapikal lezyon boyutu ve piksel değerlerinin hesaplanması.

3.7. Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal Değerlendirme için Örneklerin Hazırlanması

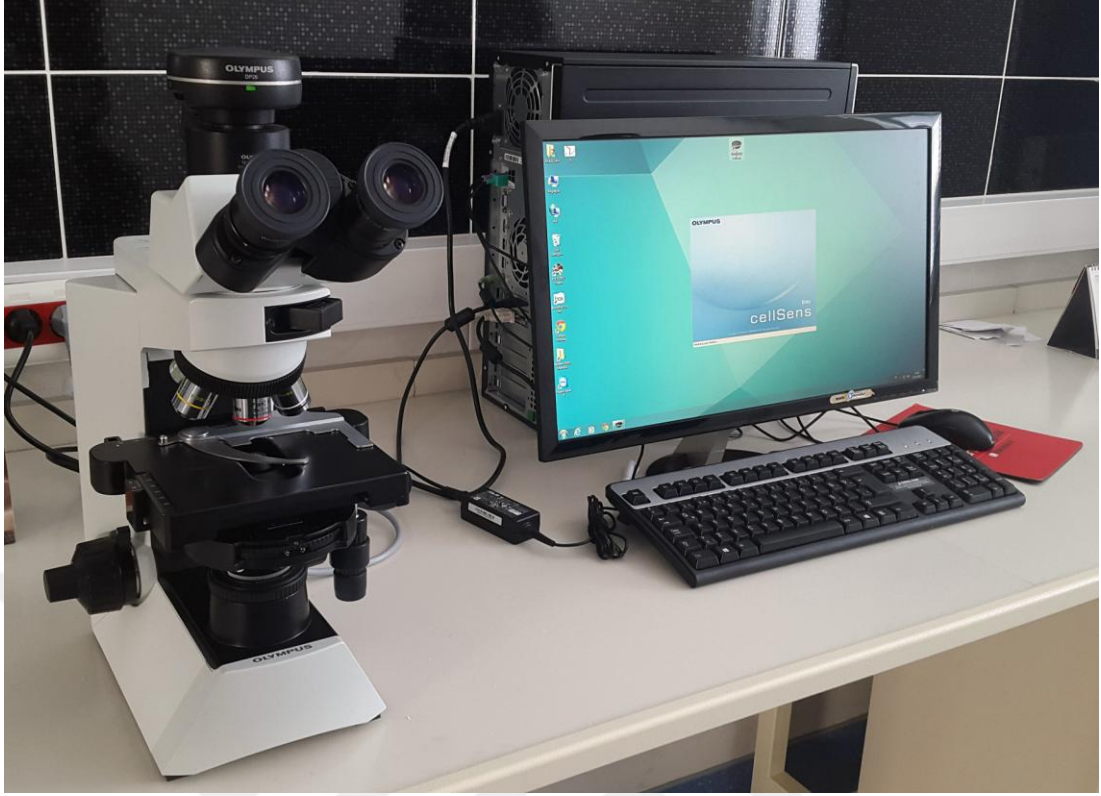
Formaldehid (%10) içeren steril kaplara yerleştirilmiş örnekler Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalına laboratuvarı'na götürüldü. Örnekler ilk olarak % 14 EDTA (Sigma, St. Louis, MO, ABD) içerisinde 3 hafta boyunca dekalsifiye edildi ve her bir rata ait sağ ve sol alt çene parçaları doku takip kasetleri içerisine konuldu. Dekalsifikasyon sonrası EDTA artıklarını uzaklaştırmak için 1 saat boyunca akan su altında yıkanan örnekler otomatik doku takip cihazına (Leica, Nussloch, Almanya) yerleştirildi (resim 15). Örneklerin bir gece boyunca doku takip cihazında düşük dereceli alkollerden yüksek dereceli alkollere (%70'den %100'e) geçirilerek sularının alınması, iki adet ksilolden geçirilerek yağının alınması ve sıcak parafinden geçirilerek doku boşluklarına parafin dolması sağlandı. Dokular ertesi sabah parafine gömülerek bloklar oluşturuldu. Dört-beş saat soğutmanın ardından bloklardan rotary mikrotomda 5 mikron (μm) kalınlığında seri kesitler alındı (Leica 2155 rotary microtome; Leica Microsystems AG, Wetzlar, Almanya). Her bir dokudan dişte açılan defekt ve periapikal dokuları kapsayan 28 adet kesit alındı ve toplamda her bir rattan 56 adet kesit alınmış oldu.



Resim 15. Otomatik doku takip cihazı

3.8. Histopatolojik Değerlendirme

Her örnekten alınan 28 kesitin 4'ü histopatolojik inceleme için Hematoksilen-Eozin (HE) ile boyandı. Histopatolojik değerlendirmeler fotoataçmanlı ışık mikroskobu (CX41, Olympus Corporation, Tokyo, Japonya) ve görüntü analiz programı ile (Database Manual Cell Sens Life Science Imaging Software System, Olympus Corporation, Tokyo, Japonya) yapıldı (resim 16).



Resim 16. Fotoataçmanlı ışık mikroskobu ve görüntü analiz programı

Periapikal dokudaki histopatolojik değişiklikler incelendi ve enflamasyonun derecesi 4 aşamada skorlandı (276)(tablo 4).

Tablo 4. Enflamasyon skorları.

Skor 0	Skor 1	Skor 2	Skor 3
Enflamatuvar yanıt yok,	<10 makrofaj ve plazma hücresi	10-25 makrofaj ve plazma hücresi,	>25 makrofaj ve plazma hücresi
>30 Fibroblastlar,	10-30 fibroblast	5-9 fibroblast	1-4 fibroblast,
Kollajen içeren olgun fibröz doku,	Az kollajen içeren olgunlaşmamış fibröz doku,	Granülasyon dokusu	Nekroz alanı,
Sağlıklı periodontal ligament (PDL), sement ve kemik dokusu	Genişlemiş PDL, sağlıklı sement ve kemik dokusu	PDL yıkımı, sement ve kemik dokusunda rezorbsiyon	PDL yıkımı, sement ve kemik dokusunda apse oluşumu

3.9. Histomorfometrik Değerlendirme

HE ile boyanmış, her örnekten elde edilen 4 kesit 4X büyütmede fotoataçmanlı ışık mikroskobu ve görüntü analiz programı ile incelendi. Meziyal kök ile ilişkili periapikal lezyon sınırları programdaki serbest çizim aracı ile belirlendi, lezyon alanı (mm²) görüntü analiz programı tarafından hesaplandı.

3.10. Brown-Brenn Analizi

Kök kanallarındaki bakteri varlığı ve lokalizasyonunun (kron, kökün koronal, orta ve apikal bölgesi, periapikal lezyon içi) belirlenmesi için her bir örnekten 4 ayrı seri kesit polilizinli lamlara çekilerek Brown-Brenn tekniğine (277) göre boyandı. Bu tekniğe göre; kesitler deparafinize ardından distile su ile hidrate edildi. Boyama rafına yerleştirilen kesitler üzerine 1ml (veya 20 damla) kristal viyole (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD) ve 5 damla sodyum bikarbonat (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD) damlatılıp 1 dakika beklendi ve akan suda yıkandı. Kesitler üzerine Gram's iodine (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD) solüsyonu damlatıldı, 1 dakika beklendi ve tekrar yıkandıktan sonra kurutma kâğıdı ile tamamen kurutuldu. Daha sonra boya fazlalığının alınması için etil eter (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD) - aseton (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD) solüsyonundan damlatıldı (doku kesitlerinin rengi tamamen açılmadan mor renkte kalması sağlandı). Bir dakika süre ile bazik fuksin (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD) uygulamasından sonra örnekler tekrar yıkandı ve tam olarak kurumalarına izin verilmeden hafifçe kurutuldu. Örnekler aseton içerisine daldırıldıktan hemen sonra kesitler sarımsı pembe renge dönene kadar pikrik asit (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD) – aseton solüsyonunda bekletildi. Hızlı bir şekilde aseton daha sonra aseton - ksilen (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD) solüsyonunda hafifçe çalkalandı ve son olarak ksilen içerisinde temizlendi (278).

Brown-Brenn boyama sonuçlarının değerlendirilmesinde De Rossi ve ark, (2008) (279) uyguladıkları yöntem modifiye edilerek kullanıldı ve skorlamada; bakteri yok [0], diş kronunda bakteri [1], koronal bölgede bakteri [2], orta bölgede

bakteri [3], apikal bölgede bakteri [4], periapikal lezyon içerisinde bakteri [5] olarak değerlendirildi.

3.11. İmmünohistokimyasal Analiz

İmmünohistokimyasal inceleme ile IL-1 β [Anti-IL-1 β antibody (ab9722), Abcam, Cambridge, UK, 1/100 dilüsyon]; RANK [Anti-RANK antibody (ab13918), Abcam, Cambridge, UK, 1/100 dilüsyon]; RANKL [Anti-RANKL antibody (ab9957), Abcam, Cambridge, UK, 1/100 dilüsyon]; OPG [Anti-OPG antibody (ab183910), Abcam, Cambridge, UK, 1/100 dilüsyon] ve TRAP [Anti-TRAP antibody (ab26135), Abcam, Cambridge, UK, 1/100 dilüsyon] reaksiyonunun saptanması için her bir örnekten 20 ayrı seri kesit (değerlendirilmek istenilen her bir parametre için her diştten 4 kesit) polilizinli lamlara çekilerek streptavidin biotin kompleks peroksidaz metoduna göre boyandı. Değerlendirilmek istenilen her bir parametre için her diştten elde edilen bu kesitler ksilol ve dereceli alkollerden geçirilerek dehidre ve deparafinize edildi. Dokular 10 dakika süreyle akan suda yıkandı ve endojen peroksidaz aktivitesini ortadan kaldırmak amacıyla %3'lük metanoldeki hidrojen peroksit ile 20 dakika muamele edildi. Dokular 2 defa 10'ar dakika süreyle fosfat tamponlu tuzlu suda (PBS) yıkandı. Gereken antikolar için mikrodalga fırında sitrat buffer solüsyonu (pH 6) ile 700'lük ayarda 5 dakika süreyle iki defa kaynatıldı ardından 10'ar dakika süreyle 2 defa PBS'de yıkandı. Daha sonra nonspesifik boyamaları önlemek amacıyla normal serumda 45 dakika süreyle tutuldu. Bu aşamadan sonra yıkama yapılmadan primer serumlar uygulandı ve oda sıcaklığında bir gece bekletildi. Ertesi gün dokular aynı şekil ve süreyle PBS'de yıkandı, takiben biotinli serum ile 30 dakika süreyle muamele edildi ve PBS'de 2 defa 10'ar dakika yıkandı. Bu işlemden sonra dokular streptoavidin ile 30 dakika süreyle inkübe edildi ve tekrar yıkandı. Örnekler 3,3'- diaminobenzidine (DAP) kromojen ile boyandı. Karşıt boyama için Harris'in hematoksileni kullanıldı ve preparatlar fotoataçmanlı ışık mikroskopunda ve görüntü analiz programı ile incelendi.

IL-1 β , RANK, RANKL, OPG için immunohistokimyasal boyanmanın yoğunluğu semikantitatif olarak 3 aşamada skorlandı; negatif (0), hafif pozitif (1), orta şiddette pozitiflik (2) ve şiddetli pozitiflik (3).

3.12. TRAP Analizi

TRAP reaksiyonunun saptanması için streptoavidin biotin peroksidaz metoduna göre boyanan örneklerde, her diş için TRAP pozitif hücre sayısı 40X objektif (CX41, Olympus Corporation, Tokyo, Japonya) altında periapikal lezyon çevresinde rastgele seçilen 5 ayrı alanda sayılarak belirlendi. Çok çekirdekli TRAP pozitif hücreler osteoklast olarak tanımlandı.

3.13. İstatistik Analiz

3.13.1. Radyografik Ölçümlerin İstatistik Analizi

Verilerin parametrik testlerin ön şartlarını sağlayıp sağlamadığı Levene testi ile kontrol edildi.

Alan ve piksel değeri açısından elde edilen veriler faktöriyel düzende tekrarlanan ölçümlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirildi. Grup ortalamaları arasındaki farklılığın belirlenmesinde çoklu karşılaştırma yöntemlerinden Tukey testi kullanıldı (p=0,05).

3.13.2. Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal Verilerin İstatistik Analizi

Histopatolojik, Brown-Brenn boyama ve immünohistokimyasal değerlendirme sonuçları ile elde edilen skor verilerinin analizinde Kruskal Wallis testi, grup ortalamaları arasındaki farklılıkların belirlenmesinde Bonferroni (Dunn) testi kullanıldı (p=0,05).

Grupların osteoklast sayılarına (TRAP analizi) ait veriler karekök dönüşümüne tabi tutulduktan sonra belirli bir olasılık dağılımı gösterip göstermediği Anderson-Darling sınamasıyla, varyansların homojenliği Levene testi ile

değerlendirildi ($p=0,05$). Verilerin analizinde parametrik testlerden tek yönlü varyans analizi ve grup ortalamaları arasındaki farklılığın belirlenmesinde Tukey testi kullanıldı ($p=0,05$).

Grupların lezyon alanlarına ait veriler parametrik testlerin ön şartlarını sağlamadığı için Kruskal Wallis testi ile analiz edildi ($p=0,05$).



4. BULGULAR

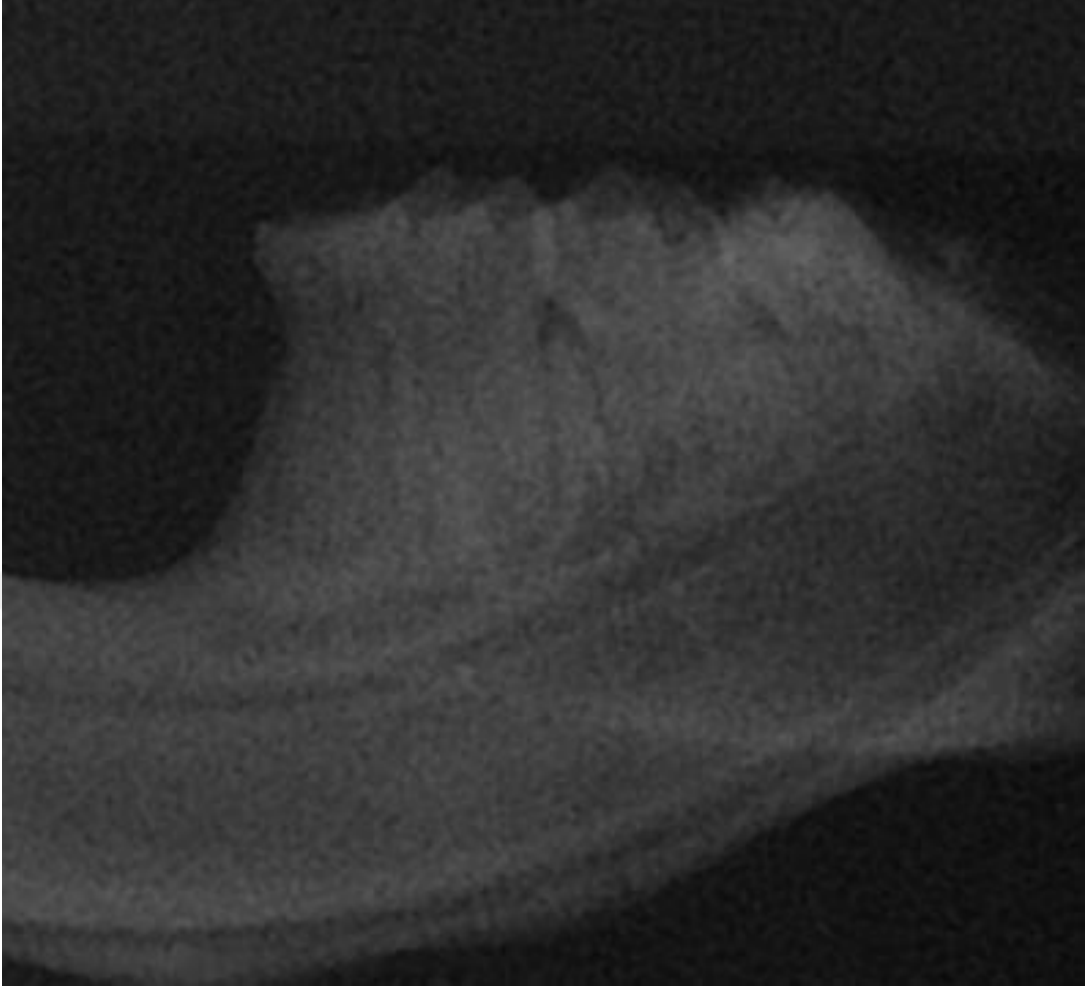
4.1. Radyografik Bulgular

Pozitif kontrol ve melatonin grubuna ait radyografik değerlendirme sonucu elde edilen periapikal lezyon alanı bulguları tablo 5’ de gösterildi. Melatonin grubunda periapikal lezyon alanı pozitif kontrol grubuna göre istatistik olarak anlamlı derecede daha küçüktü ($p<0,01$)(resim 17-19).

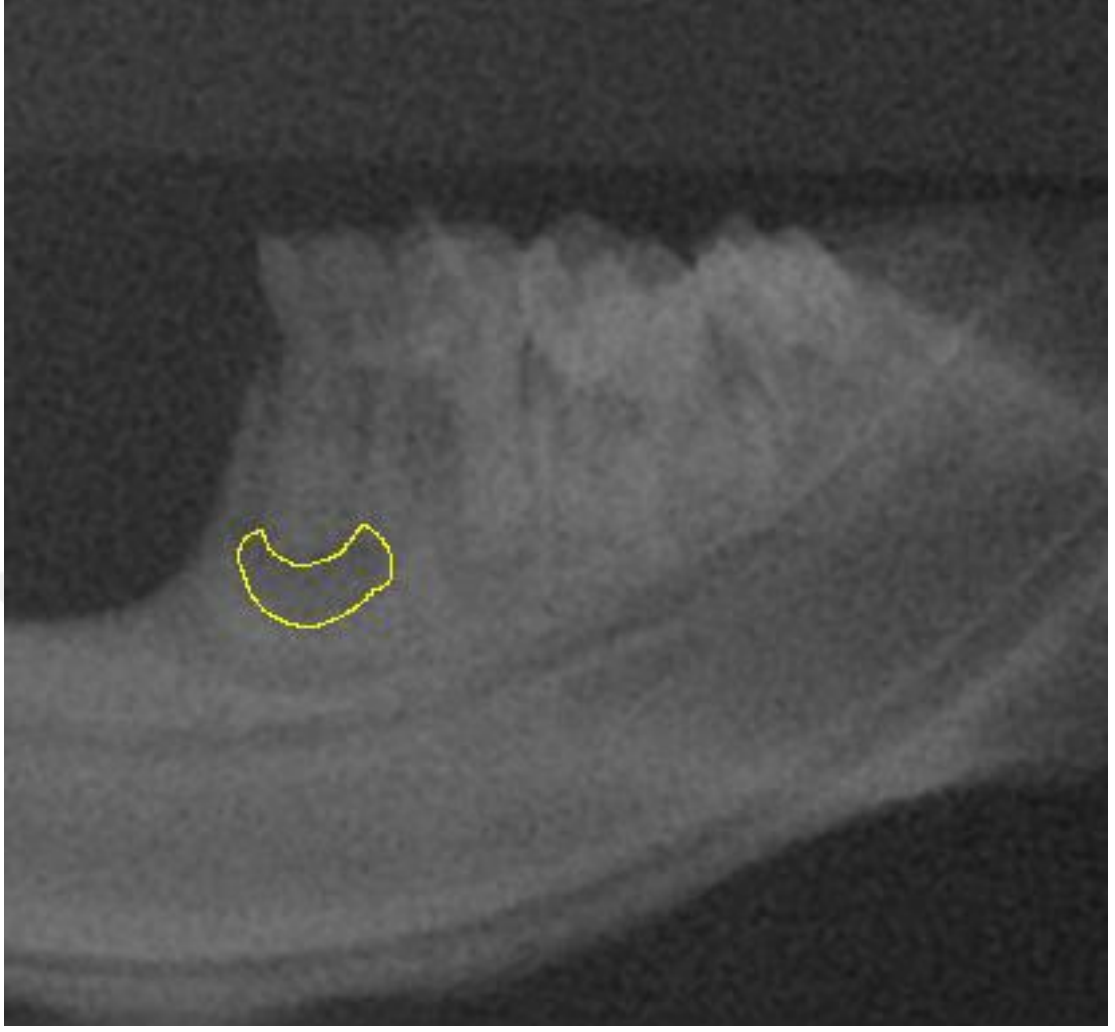
Tablo 5. Radyomikrografik incelemeler ile elde edilen pozitif kontrol ve melatonin grubuna ait periapikal lezyon alanı ortalama değerleri (mm^2) \pm standart hata.

Gruplar	Periapikal lezyon alanı (mm^2)
Pozitif kontrol (n= 20)	1,34 \pm 0,074 ^a
Melatonin (n=20)	0,95 \pm 0,074 ^b

* Aynı sütundaki farklı üst simgeler istatistik açıdan gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir ($p<0,01$).



Resim 17. Negatif kontrol grubundaki bir rata ait periapikal bölgenin radyomikrografik görünümü. Periapikal lezyon yok.



Resim 18. Pozitif kontrol grubundaki bir rata ait periapikal bölgenin radyomikrografik görünümü. Sınırları belirlenmiş periapikal lezyon alanı (1,3 mm²).



Resim 19. Melatonin grubundaki bir rata ait periapikal bölgenin radyomikrografik görünümü. Sınırları belirlenmiş periapikal lezyon alanı (1,1 mm²).

Grupların periapikal bölgeden elde edilen piksel değerleri tablo 6'da gösterildi. Negatif kontrol grubunda kök ucundaki sağlıklı kemik bölgesinin piksel değerleri, melatonin ve pozitif kontrol grubundaki lezyon alanının piksel değerinden istatistik olarak anlamlı derecede daha yüksek bulundu ($p<0,01$). Melatonin ve pozitif kontrol grubu arasında piksel değeri açısından istatistik olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$).

Tablo 6. Periapikal bölgeden elde edilen ortalama piksel değerleri \pm standart hata.

Gruplar	Piksel değerleri
Negatif Kontrol (n= 20)	73,62 \pm 0,78 ^a
Pozitif Kontrol (n= 20)	58,15 \pm 0,78 ^b
Melatonin (n= 20)	60,28 \pm 0,78 ^b

* Aynı sütundaki farklı üst simgeler istatistik açıdan gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir ($p<0,01$).

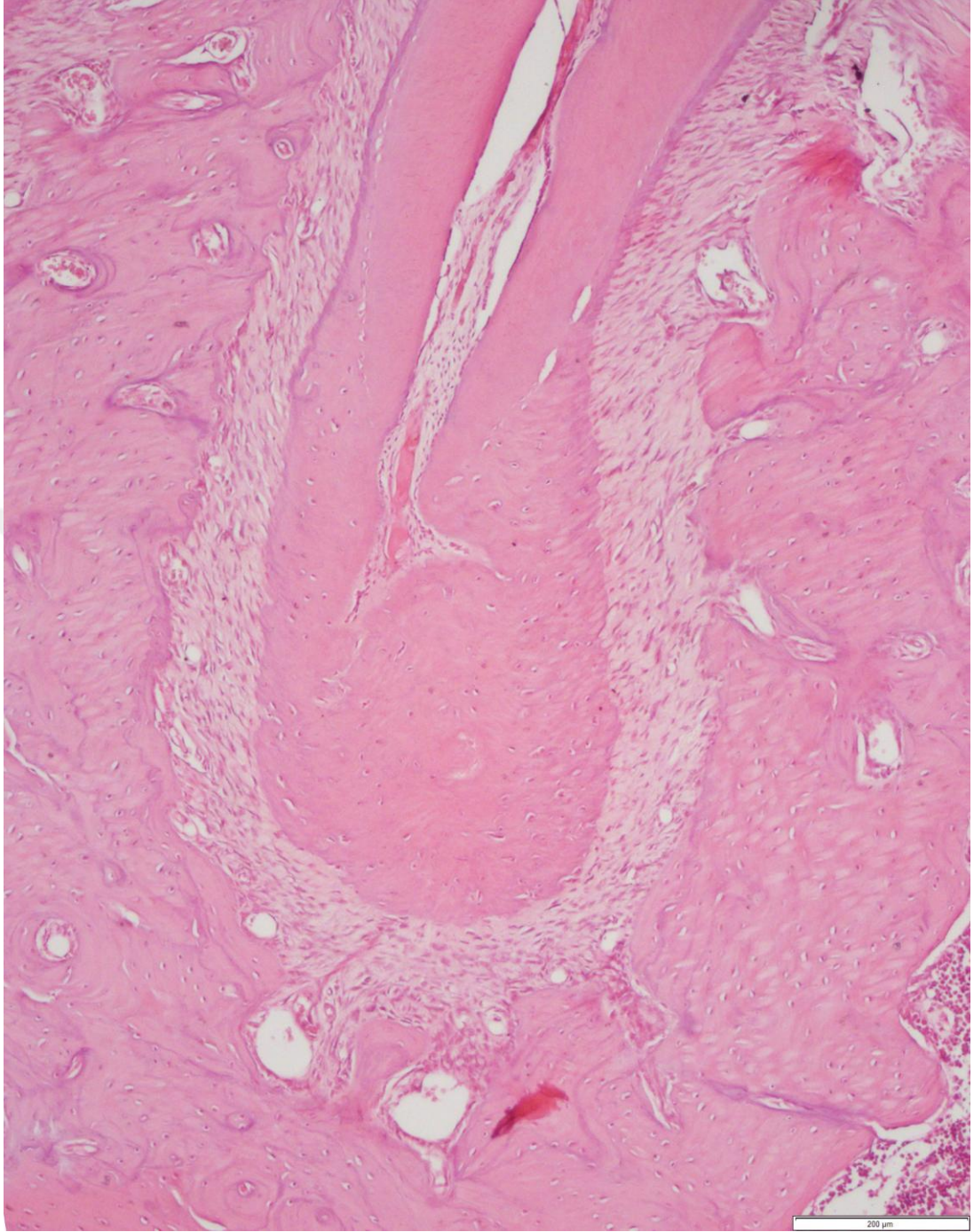
4.2. Histopatolojik Bulgular

Negatif kontrol grubundaki tüm ratlarda diş ve çevre dokuların sağlıklı olduğu görüldü ve tüm örnekler skorlamada 0 değerini aldı (resim 20). Pozitif kontrol ve melatonin gruplarında periapikal dokularda çoğunluğunu nötrofil lökositlerin oluşturduğu ve mononükleer hücrelerin de bulunduğu yangısal hücre infiltrasyonları ile karakterize periapikal lezyonların varlığı dikkati çekti (resim 21, 22). Enflamasyon şiddeti karşılaştırıldığında, semi-kantitatif değerlendirmede melatonin grubunun, pozitif kontrol grubuna göre istatistik olarak anlamlı düzeyde daha düşük skor değerleri aldığı tespit edildi ($p<0,01$) (tablo 7).

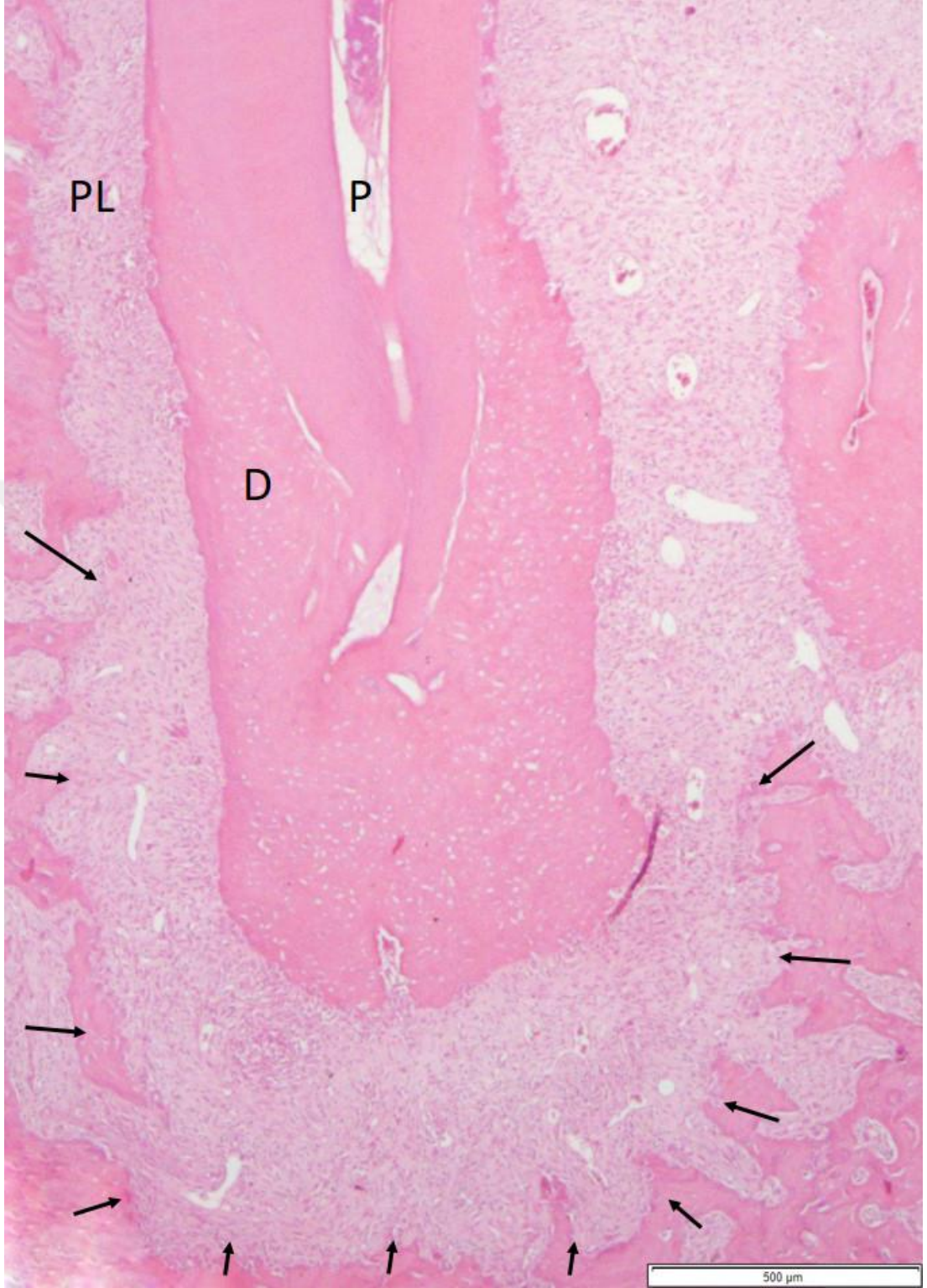
Tablo 7. Grupların histopatoloji ve Brown-Brenn boyama skorlarının ortalama \pm standart hata ve sıra sayı ortalama (rank) değerleri.

Gruplar	Enflamasyon Skorları (276)		Brown-Brenn Boyama Skorları (279)	
	Ortalama	Sıra ortalaması (rank)	Ortalama	Sıra ortalaması (rank)
Negatif Kontrol	0,00 \pm 0,00	5,5 ^C	0,7 \pm 0,15	8,6 ^b
Pozitif Kontrol	2,2 \pm 0,25	22,9 ^A	3,7 \pm 0,15	25,5 ^a
Melatonin	1,5 \pm 0,22	18,1 ^B	1,2 \pm 0,25	12,4 ^b

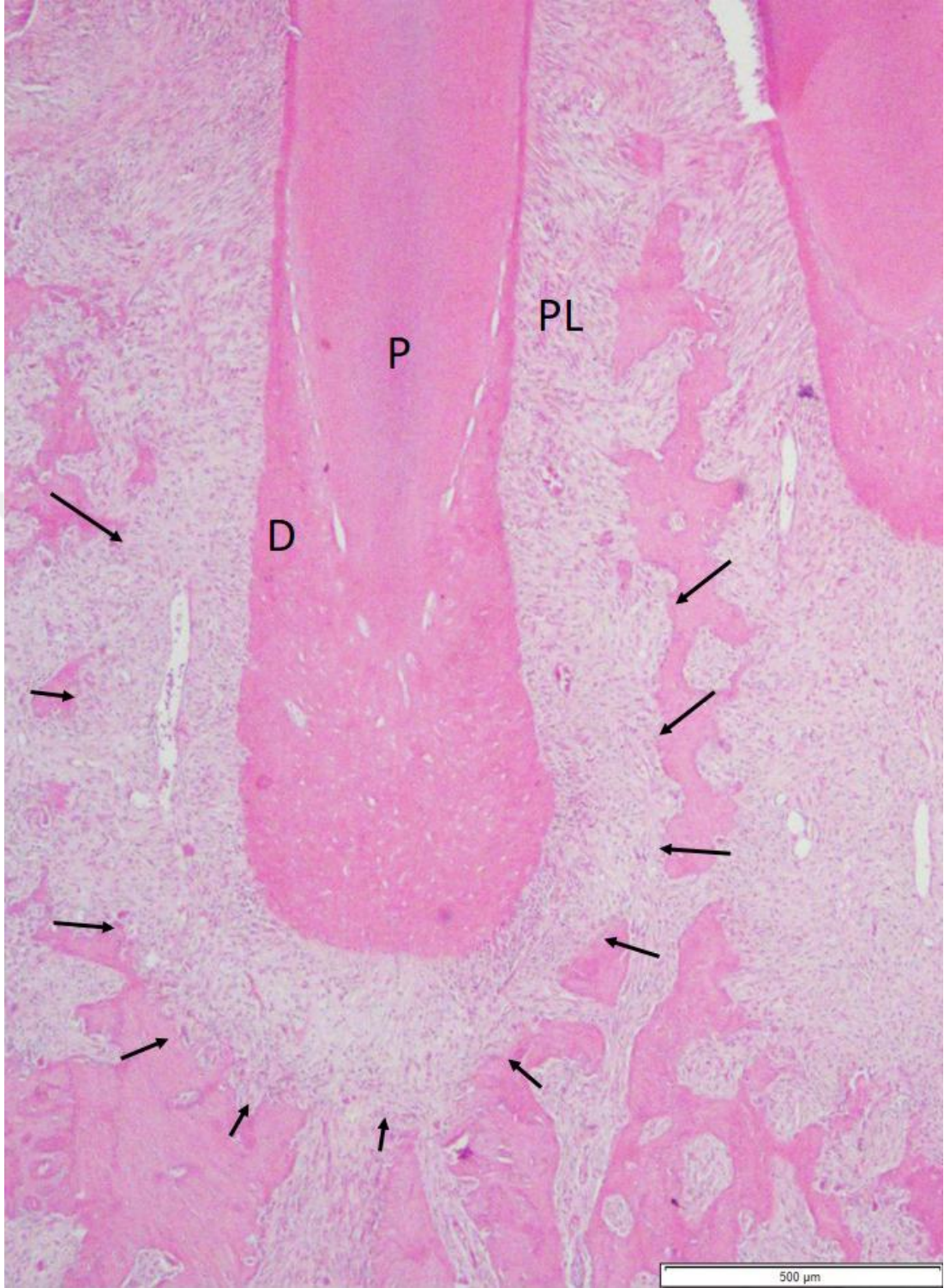
* Aynı sütundaki farklı üst simgeler istatistik açıdan gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir ($p<0,01$).



Resim 20. Negatif kontrol grubundaki bir rata ait periapikal bölgenin histopatolojik görünümü. Sağlıklı periodontal ligament, HE, Bar=200μm.



Resim 21. Pozitif kontrol grubundaki bir rata ait periapikal bölgenin histopatolojik görünümü. Yangısal hücre infiltrasyonları ile karakterize periapikal lezyon (oklar), PL (periodontal ligament), D (dentin), P (pulpa), HE, Bar=500µm.



Resim 22. Melatonin grubundaki bir rata ait periapikal bölgenin histopatolojik görünümü. Yangısal hücre infiltrasyonları ile karakterize periapikal lezyon (oklar), PL (periodontal ligament), D (dentin), P (pulpa), HE, Bar=500µm.

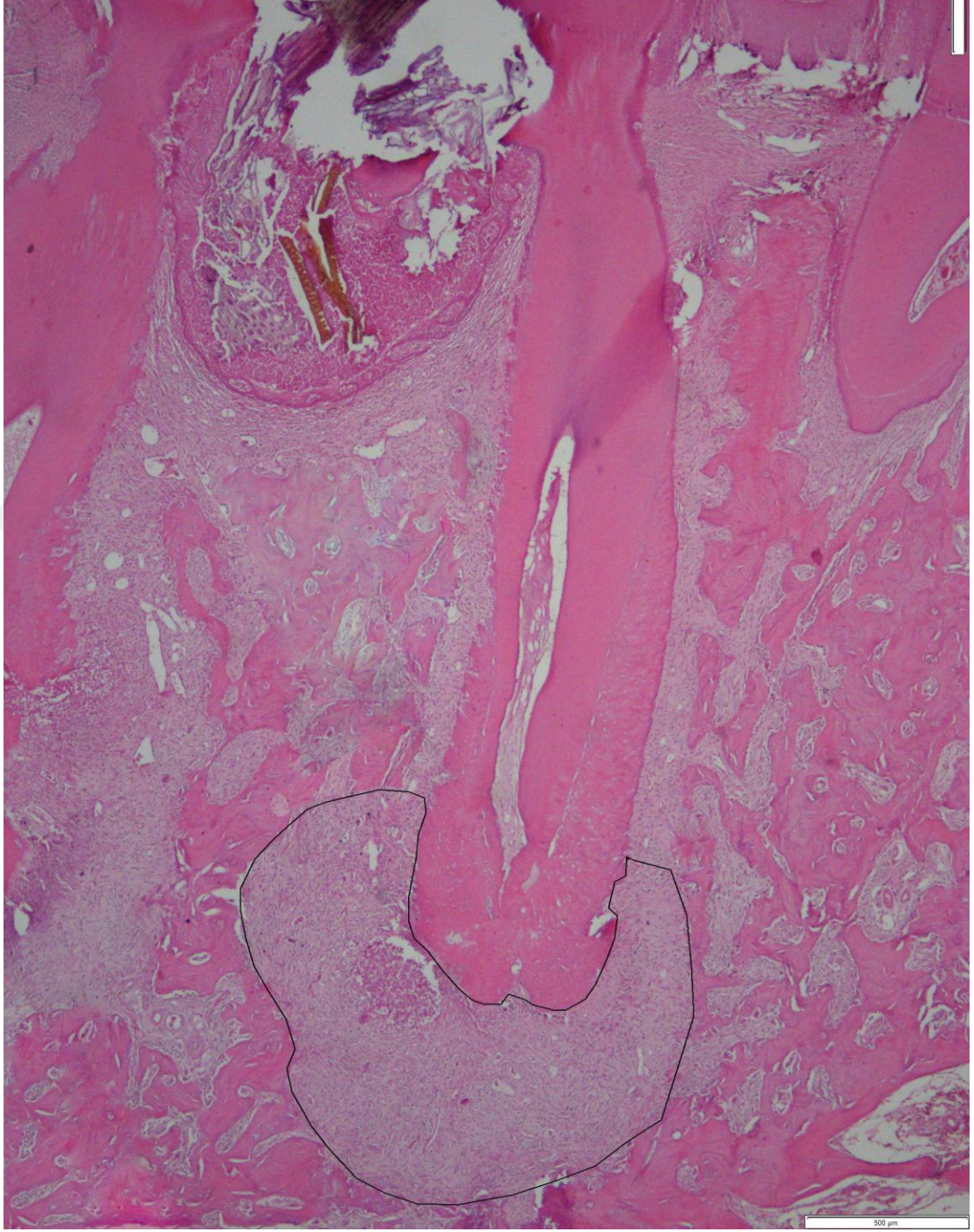
4.3. Histomorfometrik Bulgular

Pozitif kontrol ve melatonin gruplarında periapikal lezyon alanlarının histomorfometrik değerlendirilmesinde iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi ($p<0,01$) (tablo 8). Melatonin grubunda periapikal lezyon alanları pozitif kontrol grubuna göre daha küçüktü ($p<0,01$) (resim 23, 24).

Tablo 8. Histomorfometrik analiz ile elde edilen gruplara ait periapikal lezyon alanı ortalama (mm^2) \pm standart hata ve sıra sayısı ortalama (rank) değerleri.

Gruplar	Ortalama (mm^2)	Sıra ortalaması (rank)
Negatif Kontrol	0 ± 0	5,5 ^c
Pozitif Kontrol	$1,3\pm 0,18$	24,6 ^a
Melatonin	$0,6\pm 0,1$	16,8 ^b

* Aynı sütundaki farklı üst simgeler istatistik açıdan gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir ($p<0,01$).



Resim 23. Pozitif kontrol grubundaki bir rata ait sınırları belirlenmiş periapikal lezyon alanı (1,1 mm²). HE, Bar=500μm.

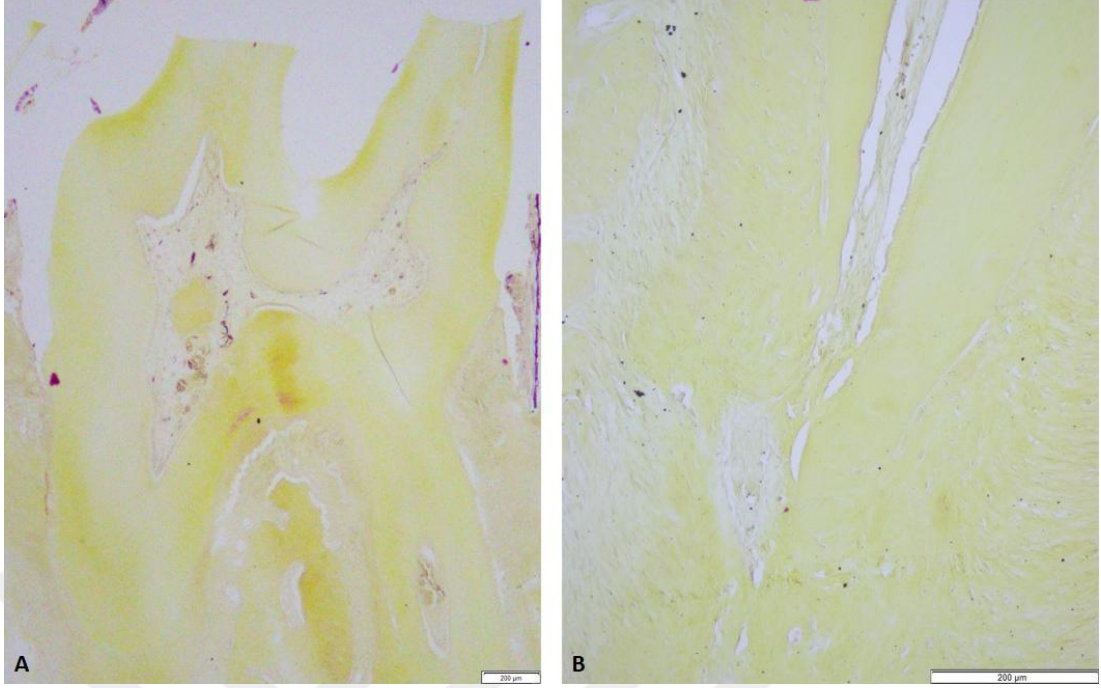


Resim 24. Melatonin grubundaki bir rata ait sınırları belirlenmiş periapikal lezyon alanı ($0,8 \text{ mm}^2$). HE, Bar= $500\mu\text{m}$.

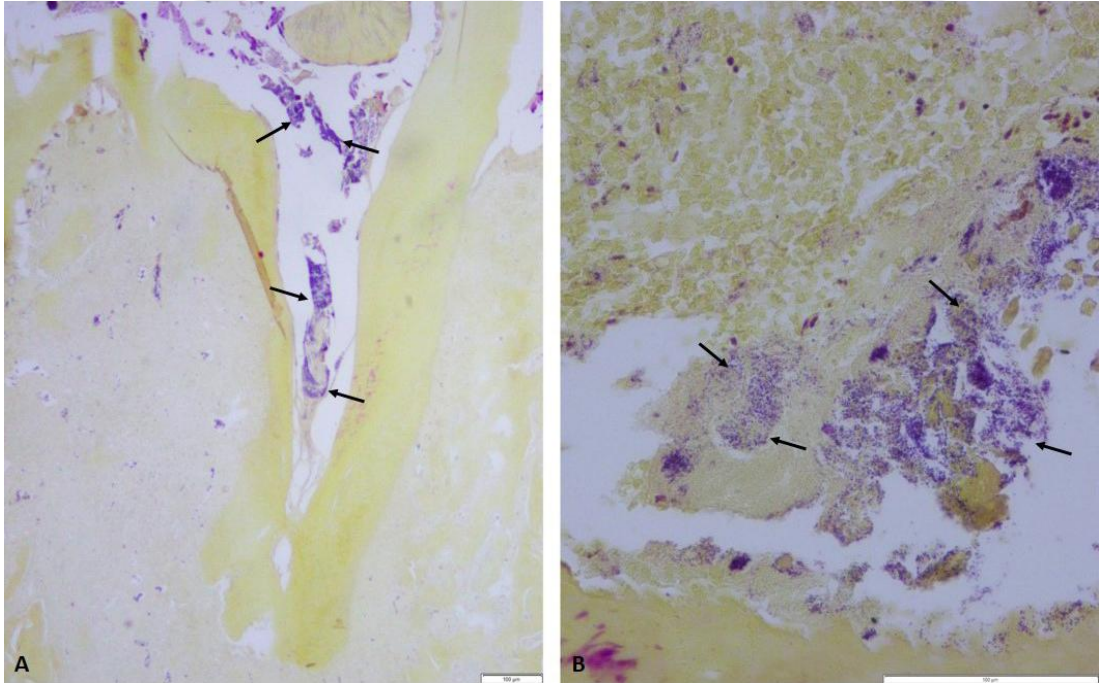
4.4. Brown-Brenn Boyama Bulguları

Bakteri yerleşimlerinin ve yoğunluğunun değerlendirilmesinde negatif kontrol grubunda bazı örneklerde sadece diş kronunda az sayıda bakteri boyanması görülürken, diş kökünde ve periapikal bölgede bakteriye rastlanmadı (resim 25). Pozitif kontrol grubunda tüm kesitlerde, özellikle kron ve kök içerisinde yaygın şekilde bakteri kümeleri dikkati çekti. Periapikal lezyonun içerisinde ise değişik yoğunluklarda bakteri kümeleri gözlemlendi (resim 26). Melatonin grubunda kron ve kök içerisinde pozitif kontrol grubuna göre daha az yoğunlukta bakteri kümeleri gözlemlendi. Periapikal lezyon içerisinde ise sadece birkaç örnekte nötrofillerce fagosite edilmiş bakterilere rastlandı (resim 27).

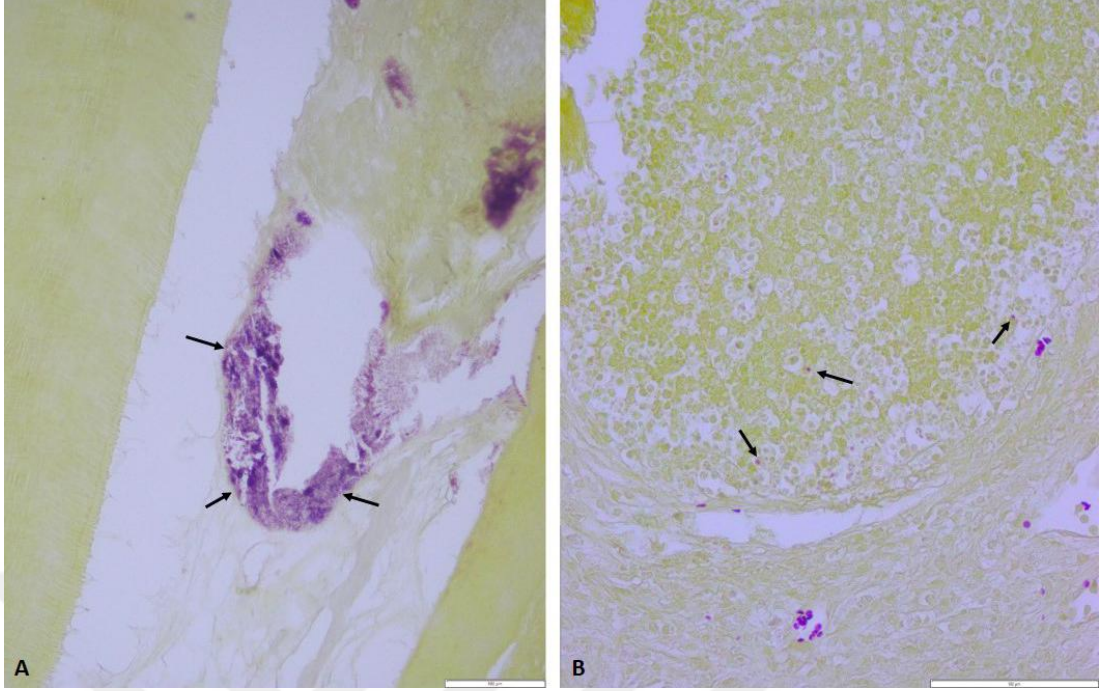
Bakterilerin büyük çoğunluğu Gram (+) basil şeklindeyken, çoğu örnekte Gram (+) ve Gram (-) basillerin karışık şekilde oldukları görüldü. Sadece birkaç örnekte Gram (-) kok tarzında bakteriler saptandı. Bakteri yerleşimi açısından negatif kontrol ve melatonin grupları arasında istatistik olarak anlamlı bir fark görülmezken ($p>0,05$), pozitif kontrol grubu örneklerinde en yüksek skor değerleri gözlemlendi ($p>0,01$) (tablo 7).



Resim 25. (A) Negatif kontrol grubundaki bir rata ait kron ve kök bölgesinden alınan bir kesit, bakteri boyanması yok, (B) Negatif kontrol grubundaki bir rata ait periapikal bölgeden alınan bir kesit, bakteri boyanması yok, Brown-Brenn Boyama (BB), Bar=200µm.



Resim 26. (A) Pozitif kontrol grubundaki bir rata ait kron ve kök bölgesinden alınan bir kesit, yoğun bakteri boyanması (oklar), (B) Pozitif kontrol grubundaki bir rata ait periapikal bölgeden alınan bir kesit, bakteri kümeleri (oklar), BB, Barlar=100µm.



Resim 27. (A) Melatonin grubundaki bir rata ait kökün orta üçlüsünden alınan bir kesit, bakteri boyanması (oklar), (B) Melatonin grubundaki bir rata ait periapikal bölgeden alınan bir kesit, nötrofiller içerisinde fagosite edilmiş az sayıda bakteri (oklar), BB, Barlar=100 μ m.

4.5. İmmünohistokimyasal Bulgular

4.5.1. IL-1 β

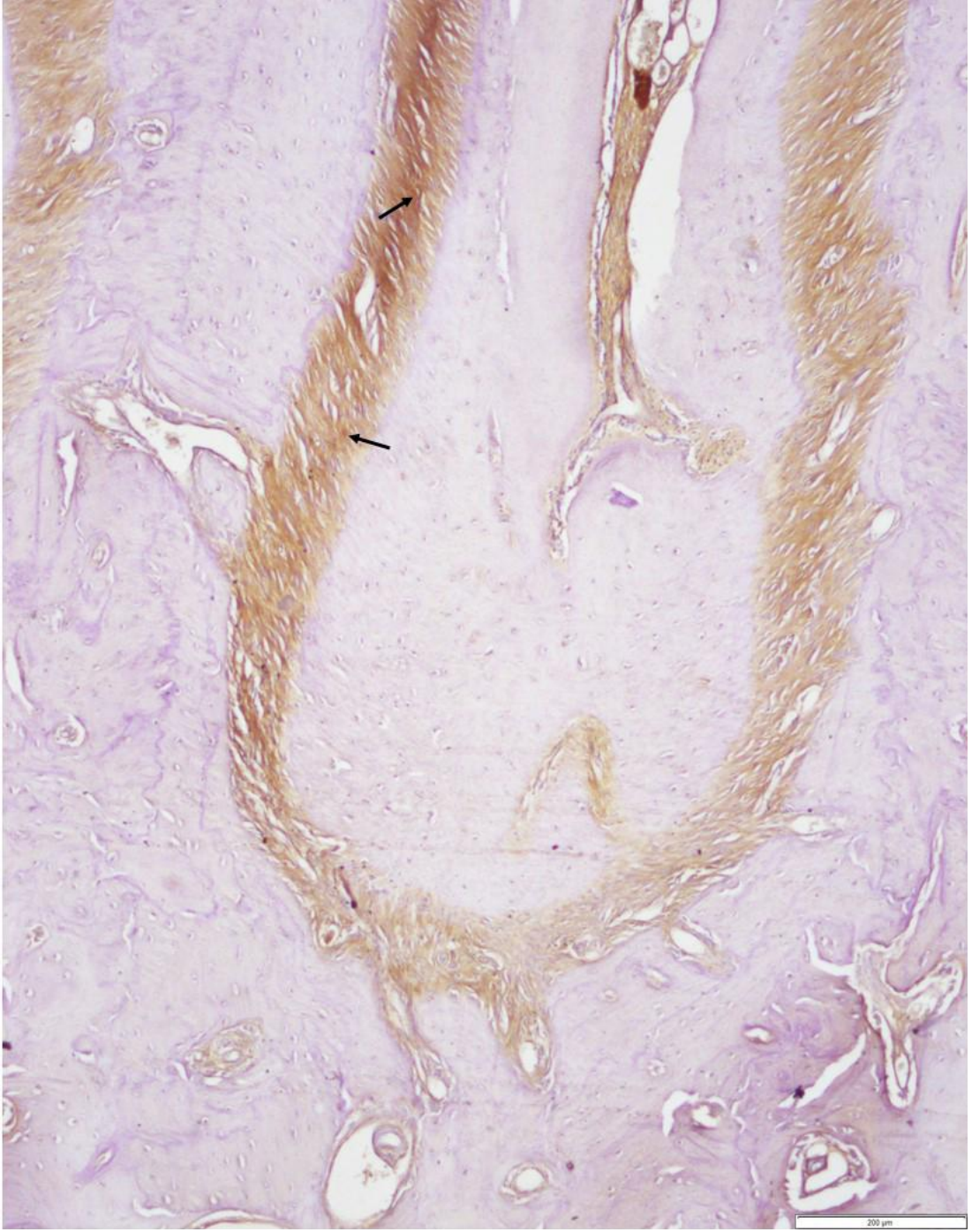
Gruplara ait IL-1 β (+) hücrelerin ortalama immunohistokimyasal boyanma yoğunluğu skorları tablo 9'da verildi.

Negatif kontrol grubunda diş çevresindeki bağ doku ile pulpadaki bazı hücrelerde hafif şiddette pozitif immun reaksiyon gözlemlendi (resim 28). Pozitif kontrol ve melatonin gruplarında IL-1 β (+) hücre yoğunluğunun negatif kontrol grubundan daha fazla olduğu görüldü ($p < 0,01$) (resim 29, 30). Melatonin grubunda IL-1 β (+) hücre yoğunluğu pozitif kontrol grubuna göre istatistik olarak anlamlı derecede daha az bulundu ($p < 0,01$).

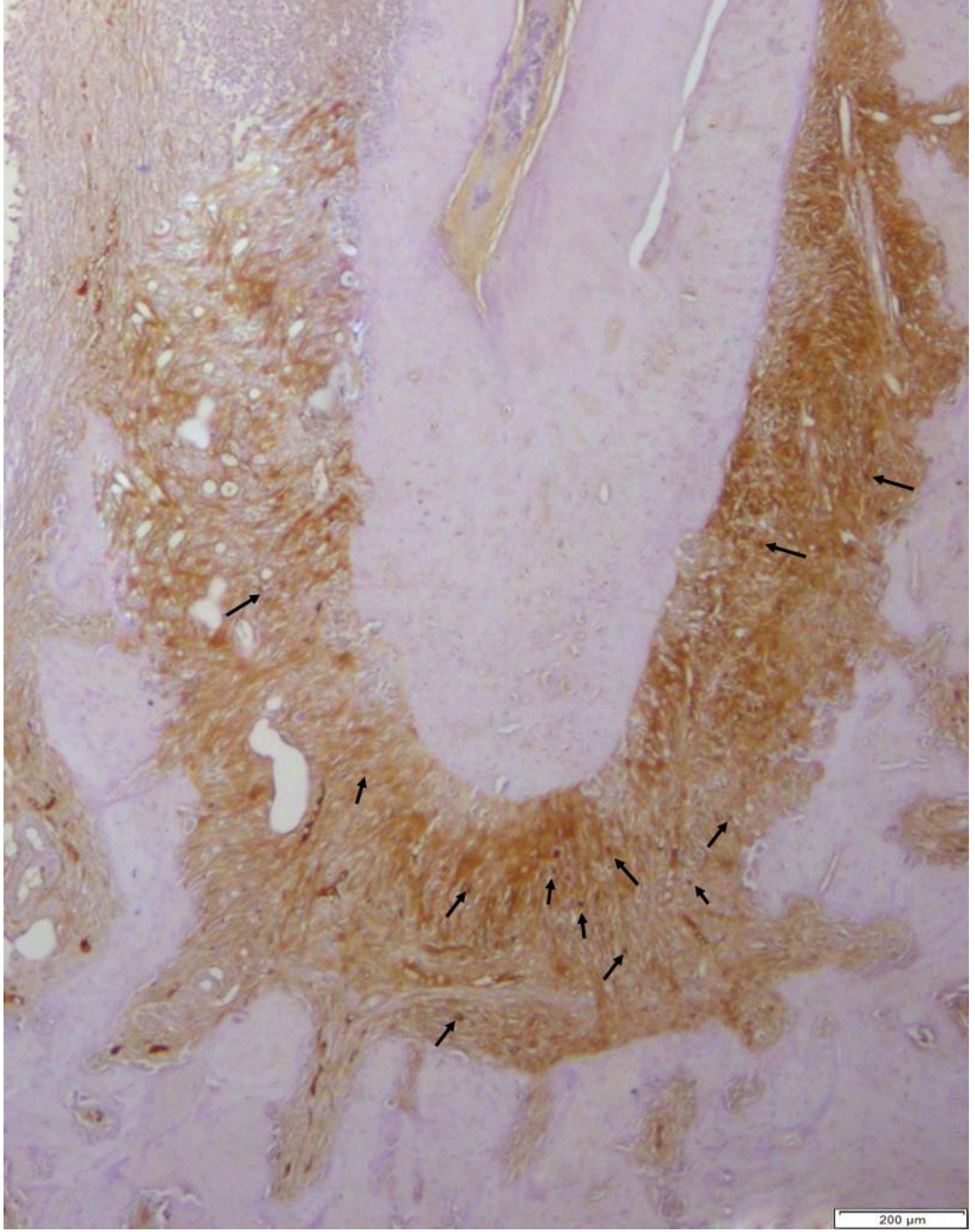
Tablo 9. IL-1 β (+), RANK (+), RANKL (+) ve OPG (+) hücrelerin immunohistokimyasal boyanma yoğunluğu skorlarının ortalama \pm standart hata ve sıra sayısı ortalama (rank) değerleri.

Gruplar	IL-1 β		RANK		RANKL		OPG	
	Ortalama	Sıra ortalaması (rank)	Ortalama	Sıra ortalaması (rank)	Ortalama	Sıra ortalaması (rank)	Ortalama	Sıra ortalaması (rank)
Negatif Kontrol	0,8 \pm 0,13	8,3 ^C	1 \pm 0,15	9,35 ^b	0,7 \pm 0,15	9,65 ^y	0,6 \pm 0,16	6,7 ^y
Pozitif Kontrol	2,3 \pm 0,21	22,5 ^A	2,5 \pm 0,17	24 ^a	2,2 \pm 0,25	23,1 ^x	1,8 \pm 0,25	16,5 ^{β}
Melatonin	1,6 \pm 0,27	15,7 ^B	1,4 \pm 0,22	13,2 ^b	1,1 \pm 0,23	13,8 ^y	2,6 \pm 0,16	23,3 ^u

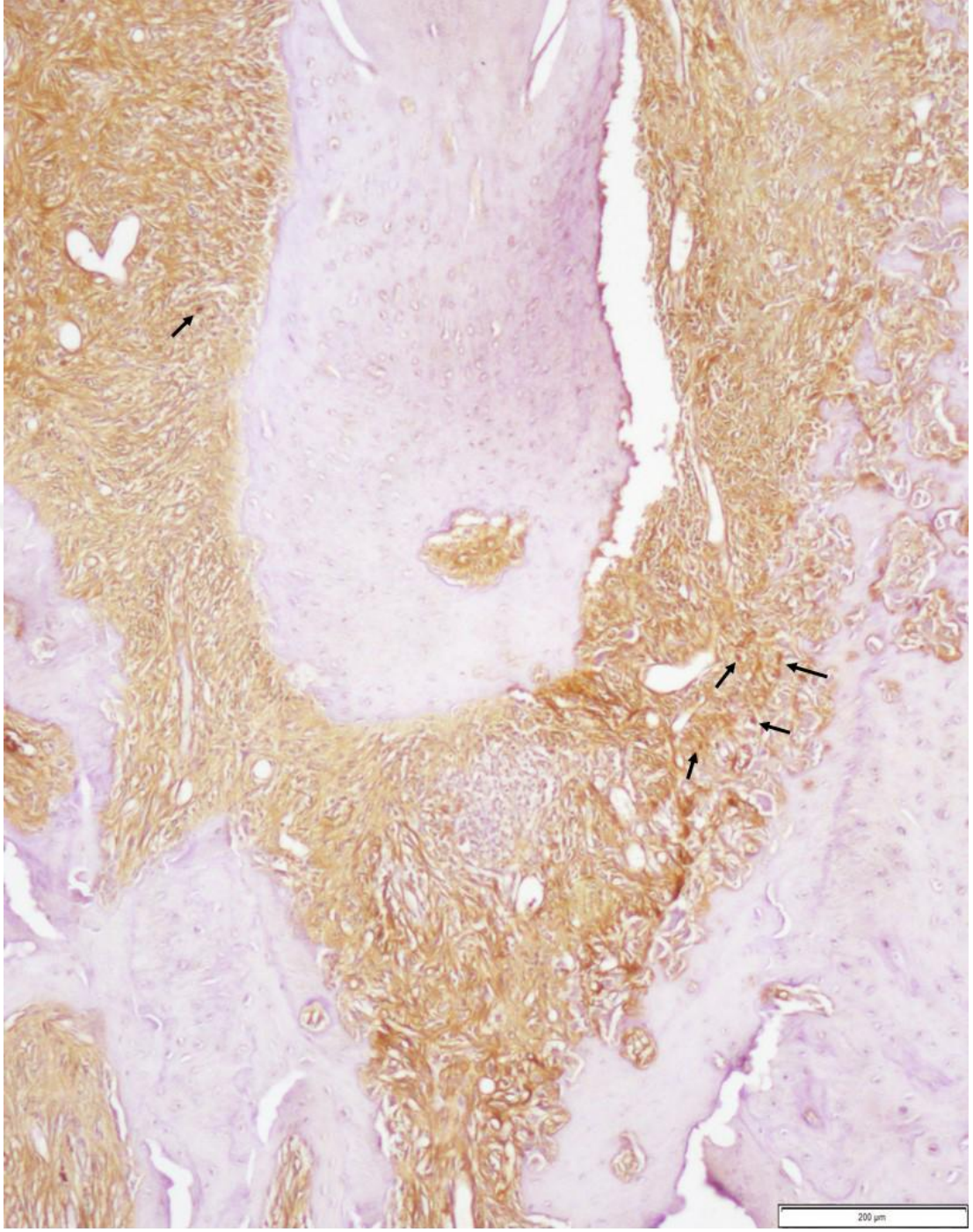
* Aynı sütundaki farklı üst simgeler istatistik açıdan gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir (p<0,01).



Resim 28. Negatif kontrol grubundaki bir rata ait periapikal bölgede IL-1 β ile immunohistokimyasal boyama, az sayıda hücrede pozitif immünreaksiyon (oklar), Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=200 μ m.



Resim 29. Pozitif kontrol grubundaki bir rata ait periapikal bölgede IL-1 β ile immunohistokimyasal boyama, çok sayıda hücrede pozitif immünreaksiyon (oklar), Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=200 μ m.



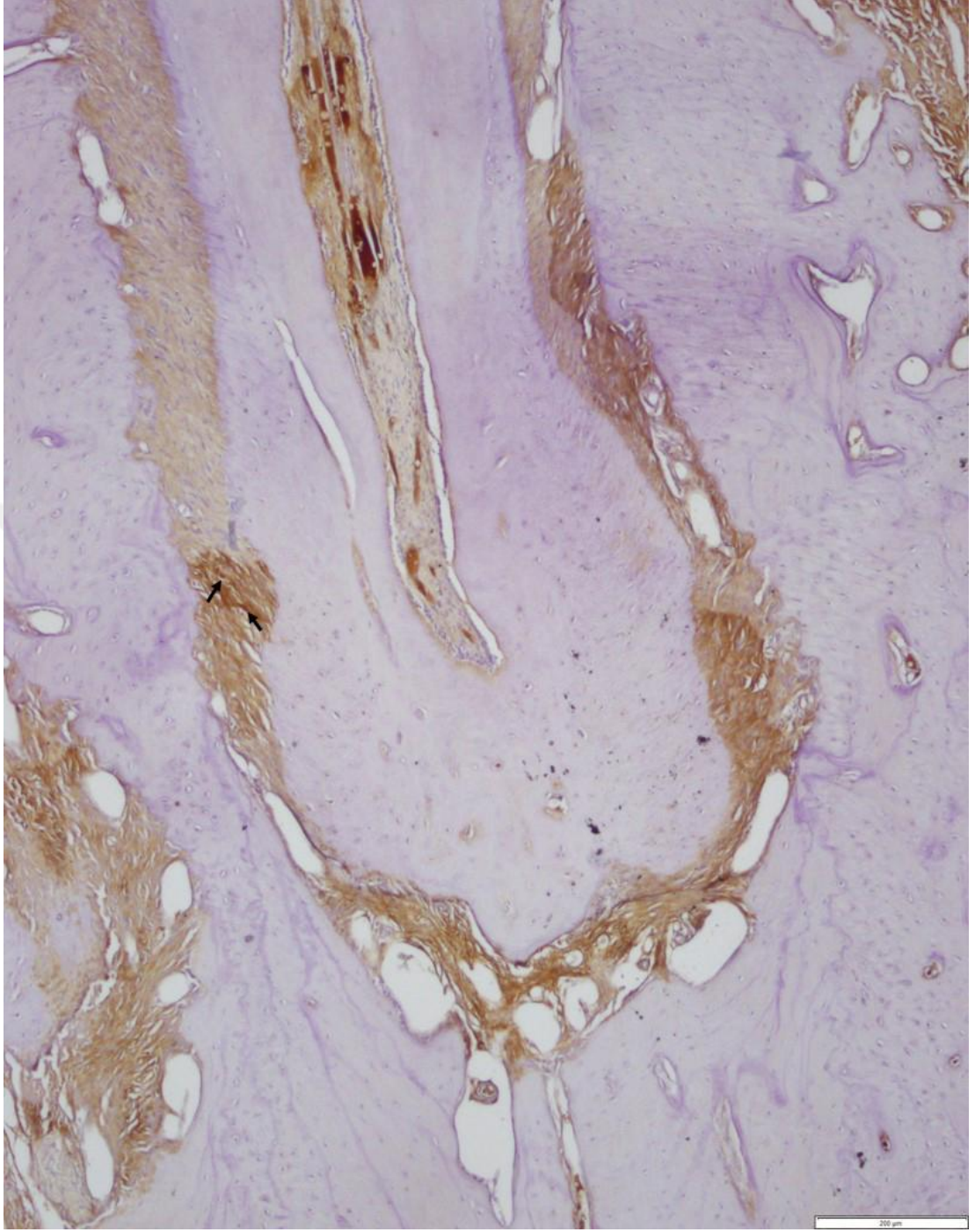
Resim 30. Melatonin grubundaki bir rata ait periapikal bölgede IL-1 β ile immunohistokimyasal boyama, az sayıda hücrede pozitif immünreaksiyon (oklar), Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=200 μ m.

4.5.2. RANK

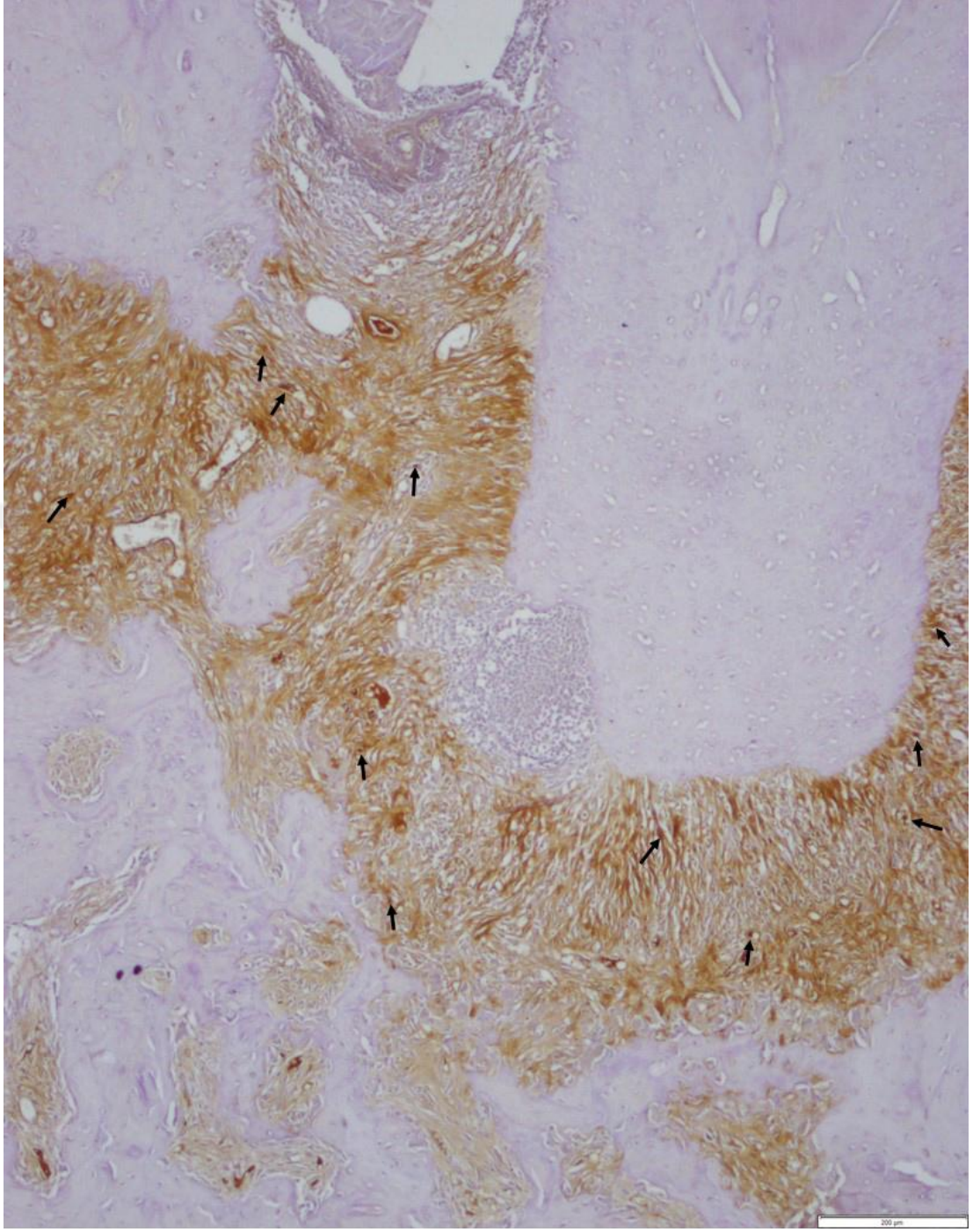
Gruplara ait RANK (+) hücrelerin ortalama immunohistokimyasal boyanma yoğunluğu skorları tablo 9'da verildi.

Negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında pozitif kontrol ve melatonin gruplarında RANK (+) hücre yoğunluğunun daha fazla olduğu tespit edildi. Melatonin grubunda RANK (+) hücre yoğunluğu pozitif kontrol grubuna göre istatistik olarak anlamlı derecede daha azken ($p<0,01$), negatif kontrol grubu ile aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$) (resim 31-33).





Resim 31. Negatif kontrol grubundaki bir rata ait periapikal bölgede RANK ile immunohistokimyasal boyama, az sayıda hücrede pozitif immünreaksiyon (oklar), Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=200μm.



Resim 32. Pozitif kontrol grubundaki bir rata ait periapikal bölgede RANK ile immunohistokimyasal boyama, çok sayıda hücrede pozitif immünreaksiyon (oklar), Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=200μm.



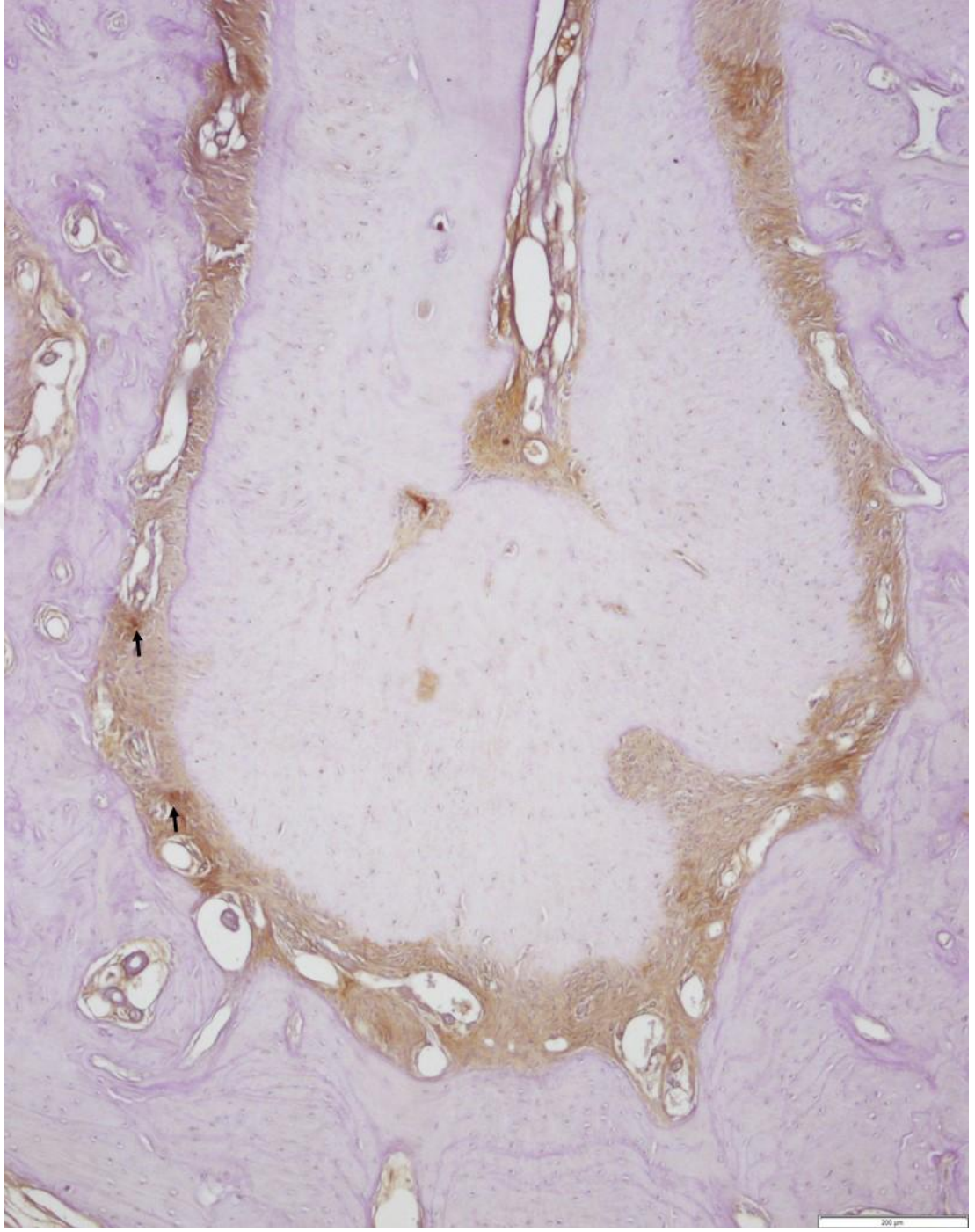
Resim 33. Melatonin grubundaki bir rata ait periapikal bölgede RANK ile immunohistokimyasal boyama, az sayıda hücrede pozitif immünreaksiyon (oklar), Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=200μm.

4.5.3. RANKL

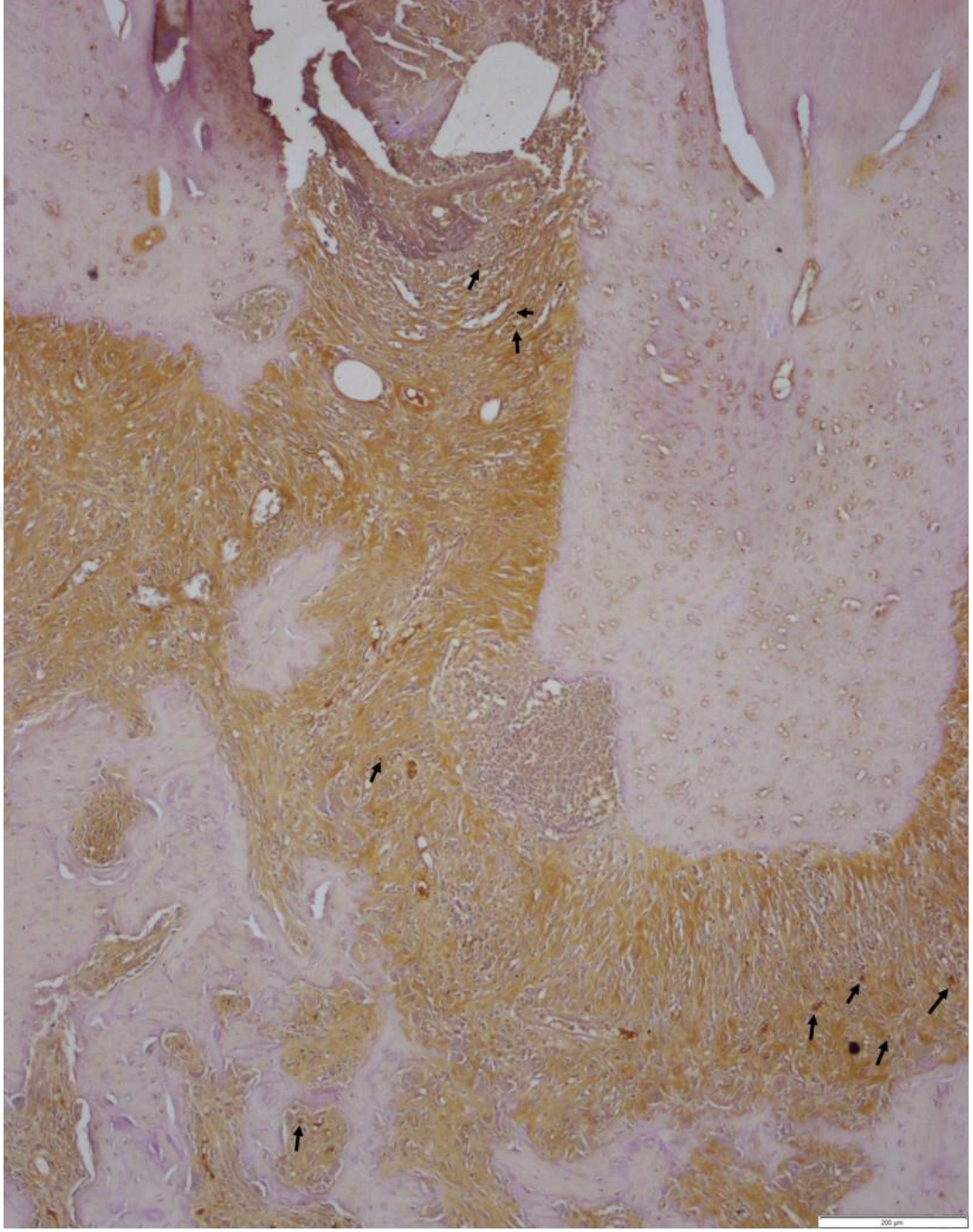
Gruplara ait RANKL (+) hücrelerin ortalama immunohistokimyasal boyanma yoğunluğu skorları tablo 9'da verildi.

Pozitif kontrol ve melatonin gruplarında RANKL (+) hücre yoğunluğunun negatif kontrol grubuna göre daha fazla olduğu tespit edildi. Melatonin grubunda RANKL (+) hücre yoğunluğu pozitif kontrol grubuna göre istatistik olarak anlamlı derecede daha azdı ($p<0,01$). Negatif kontrol ve melatonin grupları arasında RANKL (+) hücre yoğunluğu açısından istatistik olarak anlamlı derecede bir fark bulunmadı ($p>0,05$) (resim 34-36).

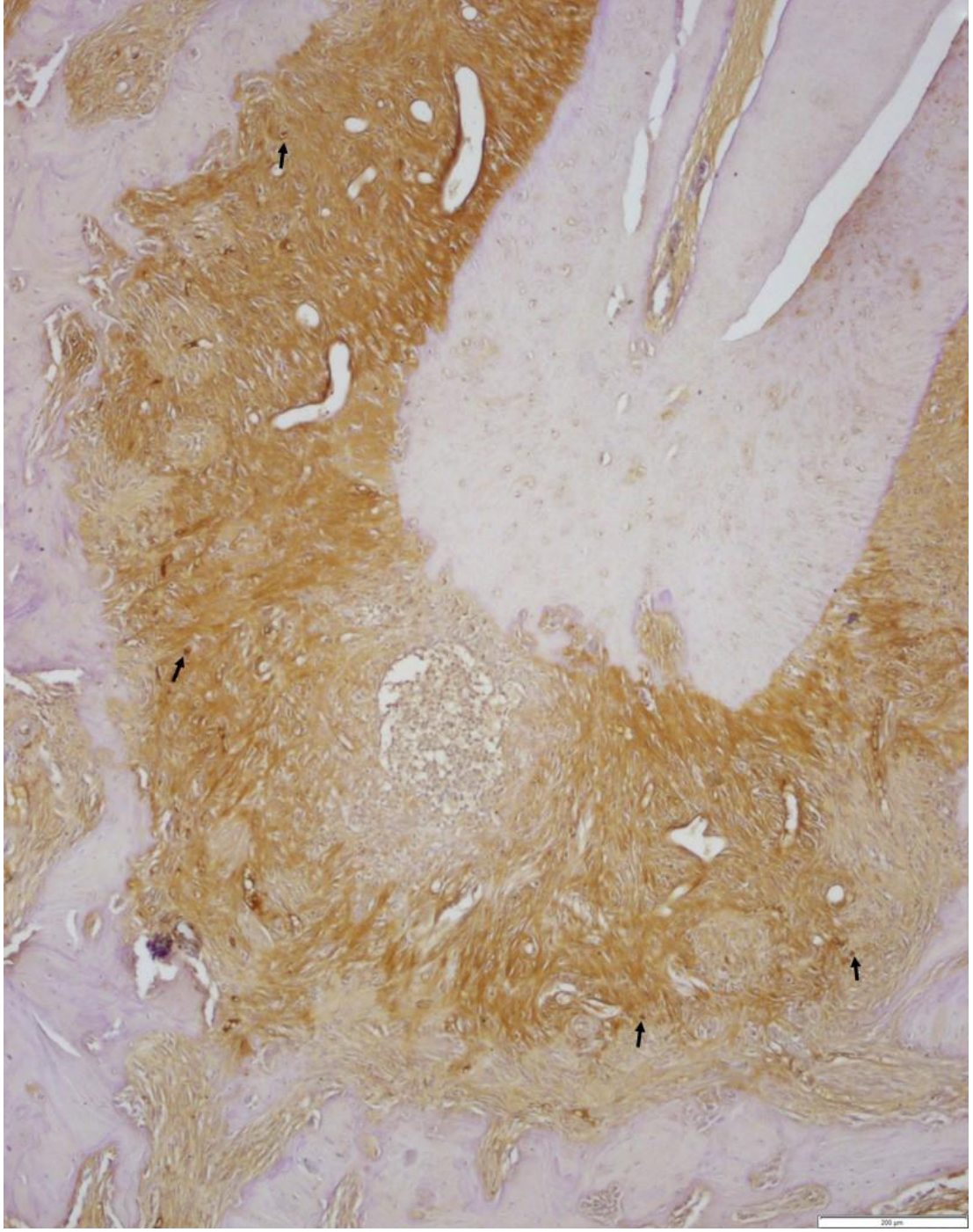




Resim 34. Negatif kontrol grubundaki bir rata ait periapikal bölgede RANKL ile immunohistokimyasal boyama, az sayıda hücrede pozitif immünreaksiyon (oklar), Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=200µm.



Resim 35. Pozitif kontrol grubundaki bir rata ait periapikal bölgede RANKL ile immunohistokimyasal boyama, çok sayıda hücrede pozitif immünreaksiyon (oklar), Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=200μm.



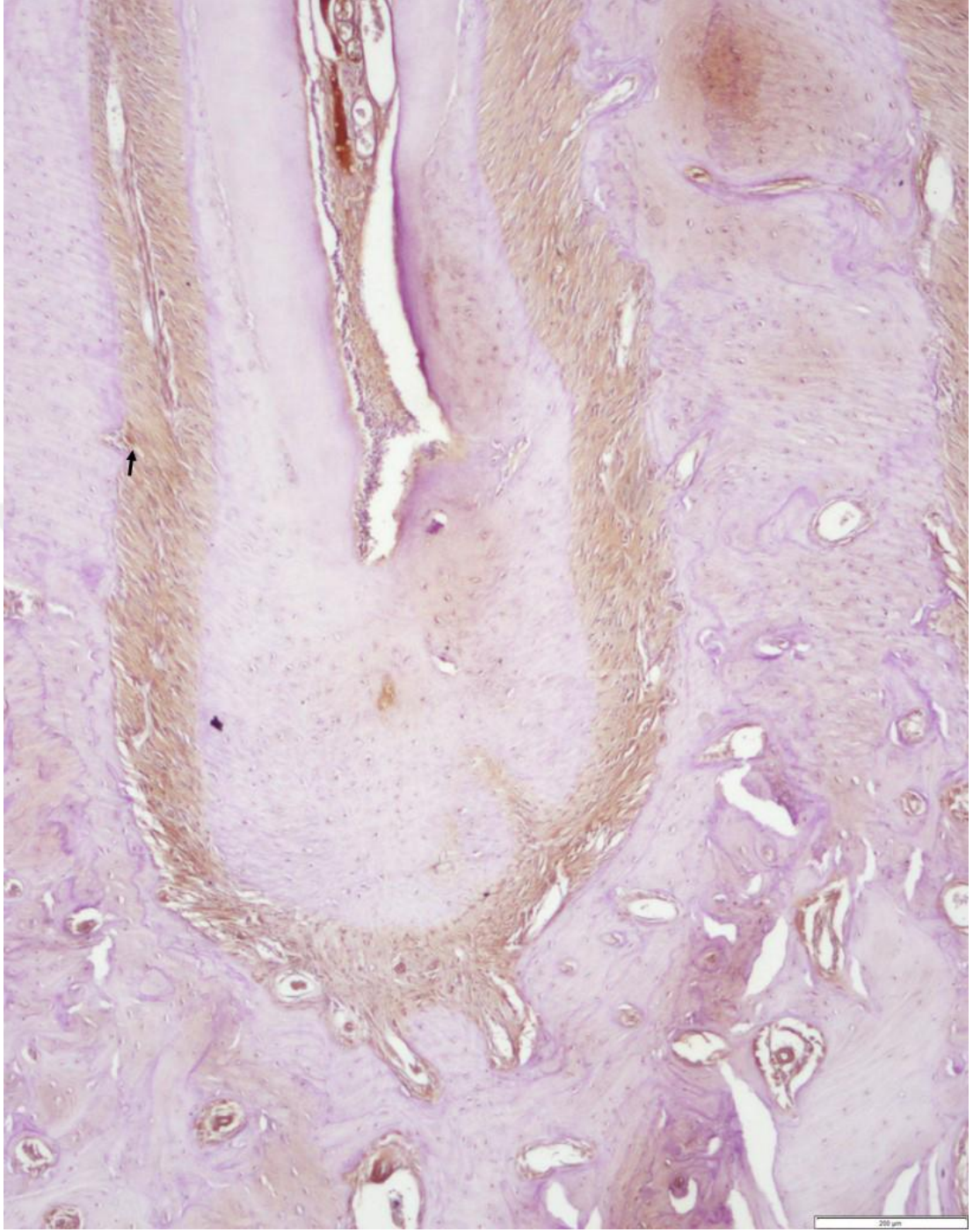
Resim 36. Melatonin grubundaki bir rata ait periapikal bölgede RANKL ile immunohistokimyasal boyama, az sayıda hücrede pozitif immünreaksiyon (oklar), Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=200μm.

4.5.4. OPG

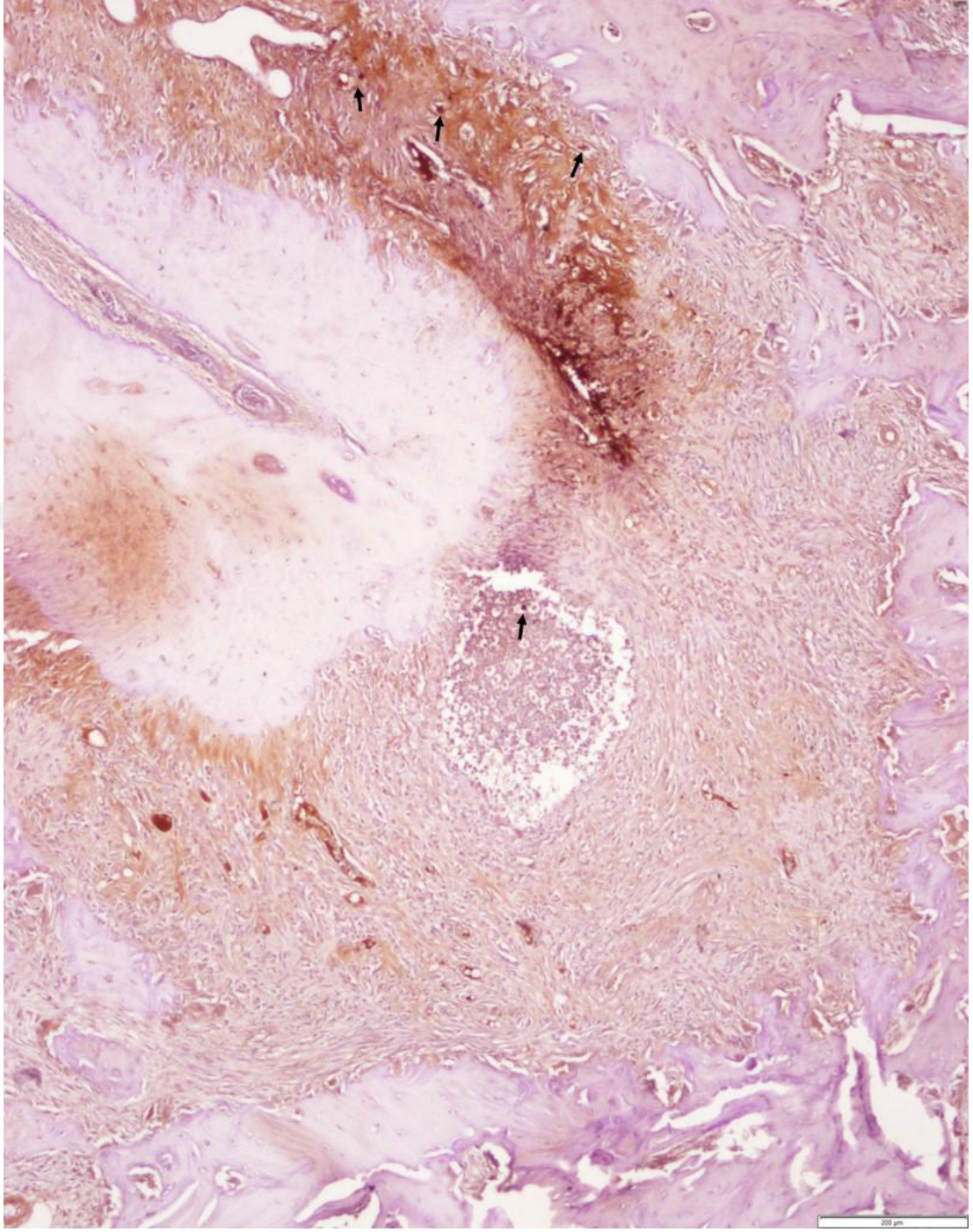
Gruplara ait OPG (+) hücrelerin ortalama immunohistokimyasal boyanma yoğunluğu skorları tablo 9’da verildi.

Negatif kontrol grubunda az sayıda OPG (+) hücre saptanırken, pozitif kontrol ve melatonin gruplarında OPG (+) hücre yoğunluğunun daha fazla olduğu tespit edildi ($p<0,01$). Melatonin grubunda OPG (+) hücre yoğunluğu pozitif kontrol grubuna göre istatistik olarak anlamlı derecede fazla bulundu ($p<0,01$) (resim 37-39).

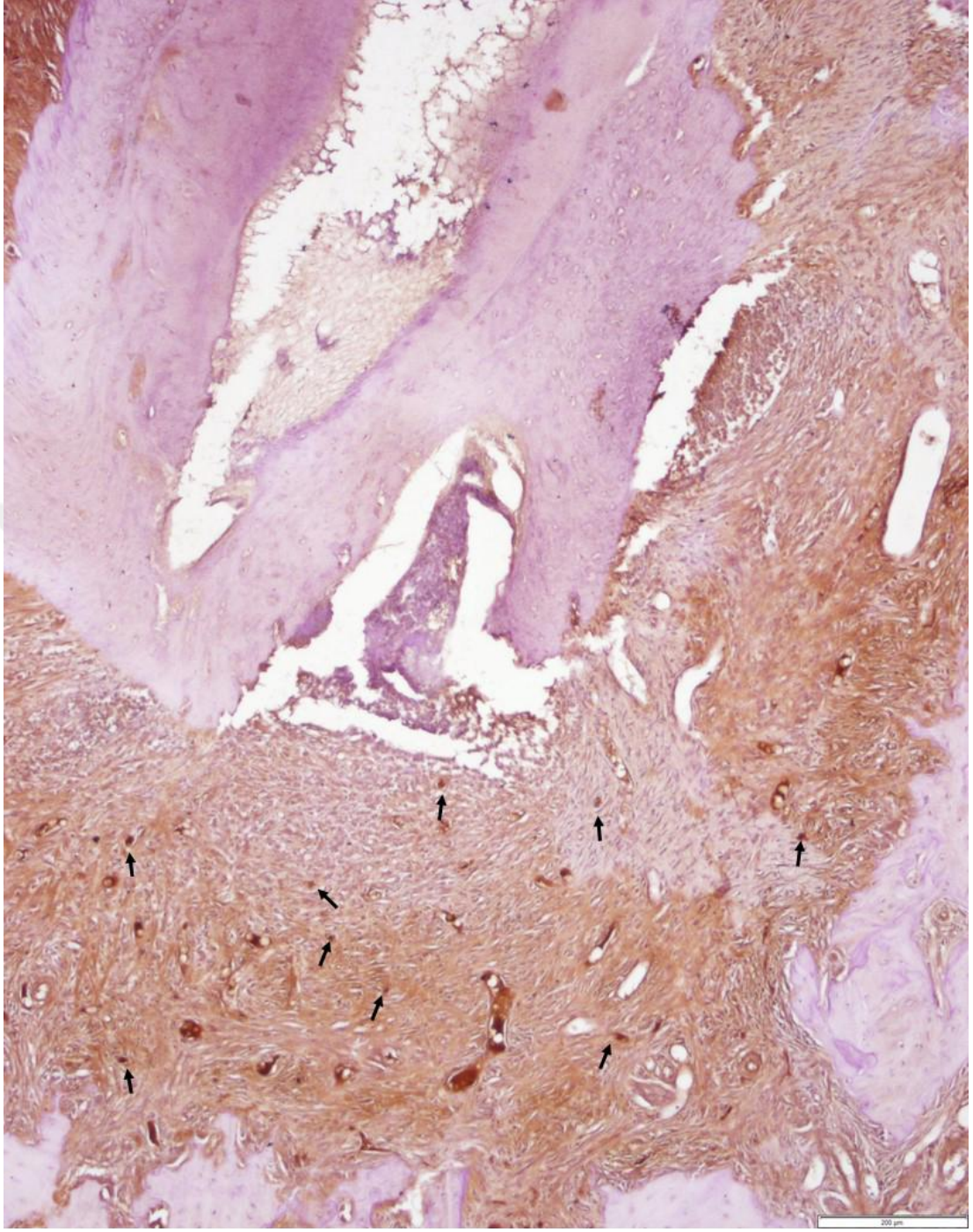




Resim 37. Negatif kontrol grubundaki bir rata ait periapikal bölgede OPG ile immunohistokimyasal boyama, az sayıda hücrede pozitif immünreaksiyon (oklar), Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=200μm.



Resim 38. Pozitif kontrol grubundaki bir rata ait periapikal bölgede OPG ile immunohistokimyasal boyama, çok sayıda hücrede pozitif immünreaksiyon (oklar), Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=200μm.



Resim 39. Melatonin grubundaki bir rata ait periapikal bölgede OPG ile immunohistokimyasal boyama, çok sayıda hücrede pozitif immünreaksiyon (oklar), Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=200µm.

4.5.5. TRAP

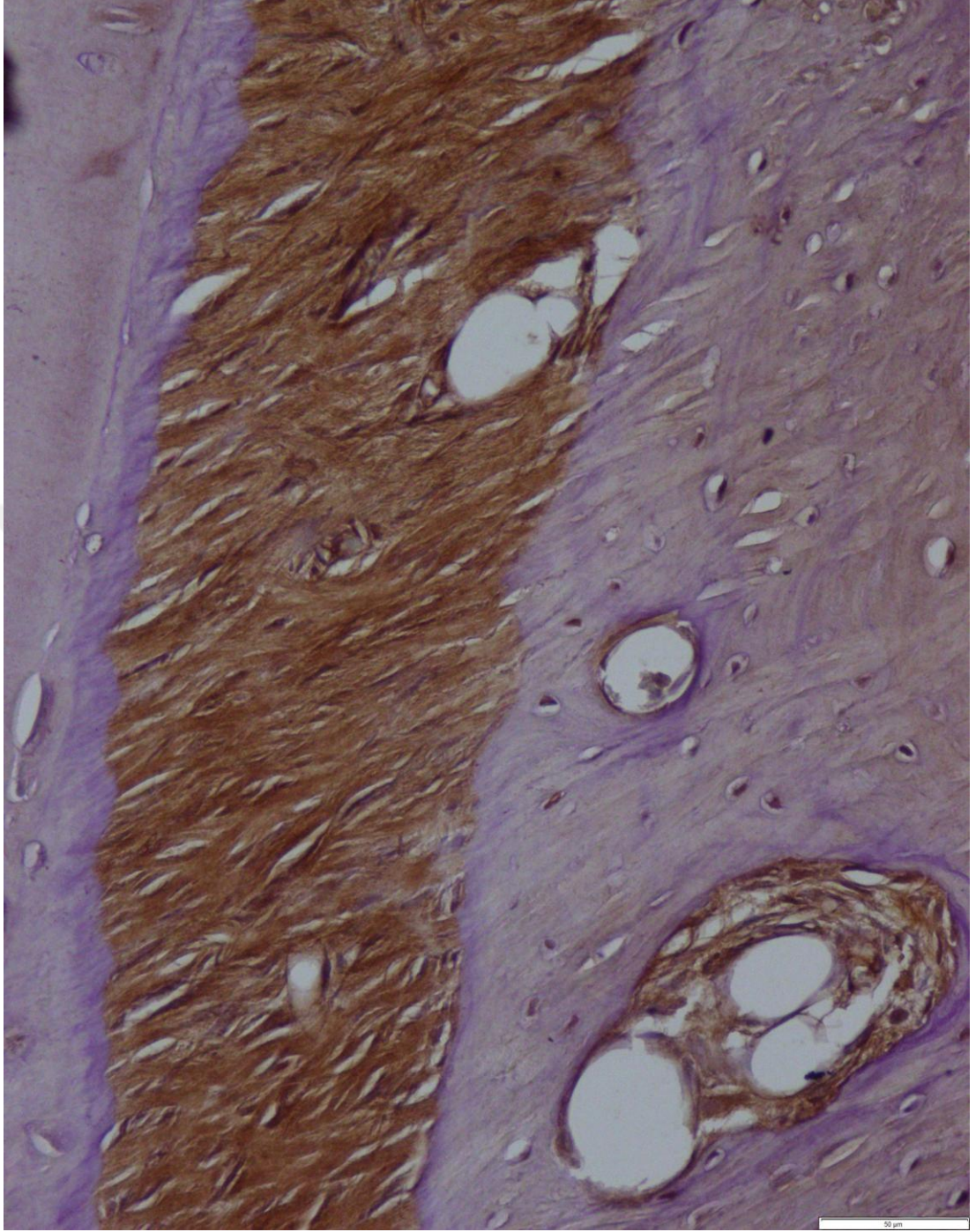
Gruplara ait TRAP (+) (osteoklast) hücre sayısı ortalamaları tablo 10'da verildi.

Pozitif kontrol ve melatonin gruplarındaki TRAP (+) (osteoklast) hücre sayısı negatif kontrol grubuna göre daha fazla bulundu ($p<0,01$). En fazla TRAP (+) (osteoklast) hücre pozitif kontrol grubundaydı ($p<0,01$) (resim 40-42).

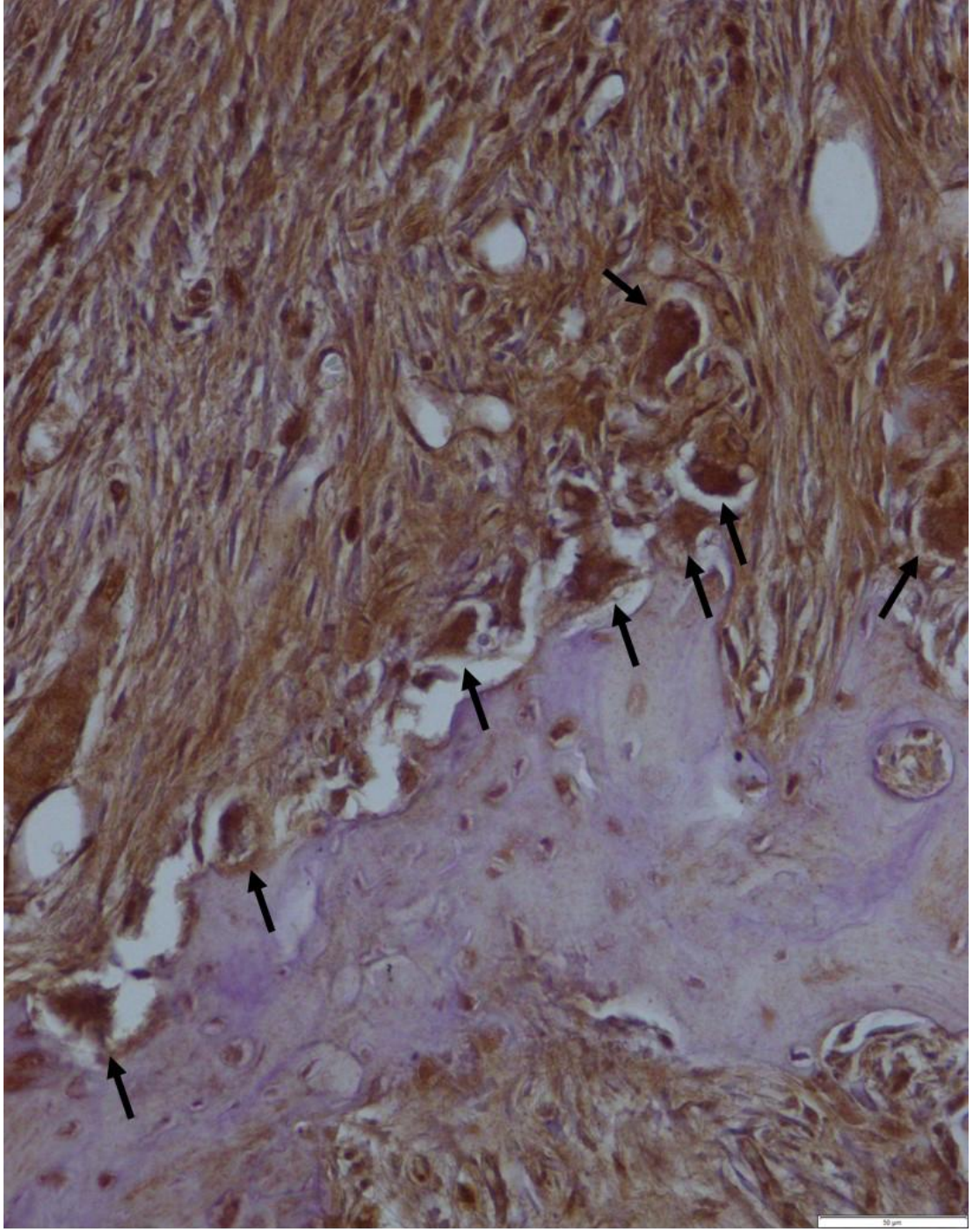
Tablo 10. Gruplara ait immunohistokimyasal TRAP (+) (osteoklast) hücre sayıları \pm standart hata.

Gruplar	TRAP (+) (osteoklast) hücre
Negatif Kontrol (n= 10)	7,5 \pm 0,9 ^c
Pozitif Kontrol (n= 10)	30 \pm 2,58 ^a
Melatonin (n= 10)	14,1 \pm 2 ^b

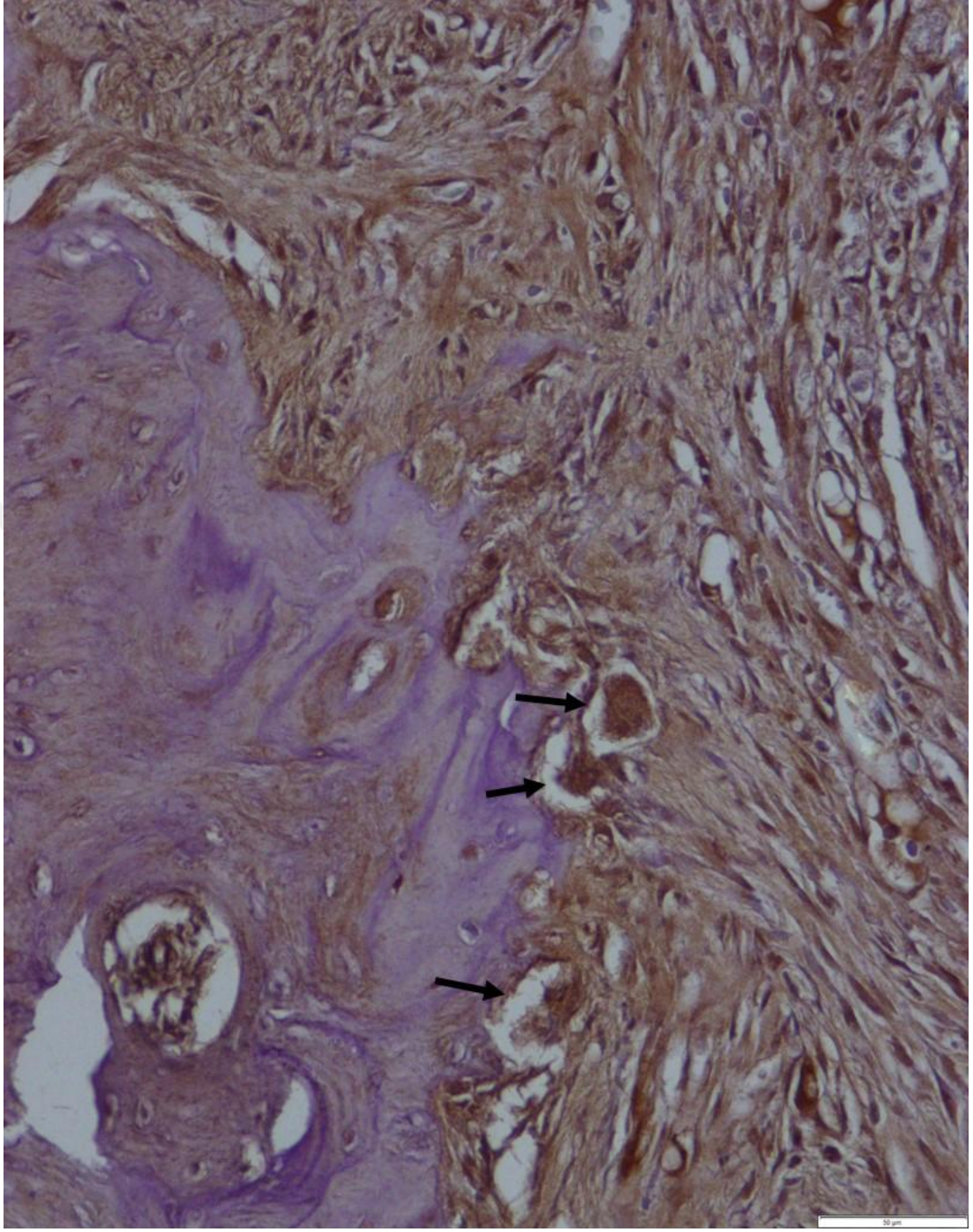
* Aynı sütundaki farklı üst simgeler istatistik açıdan gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir ($p<0,01$).



Resim 40. Negatif kontrol grubundaki bir rata ait periapikal bölgede TRAP ile immunohistokimyasal boyama, pozitif immünreaksiyon gösteren hücre (osteoklast) yok, Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=50μm.



Resim 41. Pozitif kontrol grubundaki bir rata ait periapikal bölgede TRAP ile immunohistokimyasal boyama, çok sayıda hücrede pozitif immünreaksiyon (osteoklastlar=oklar), Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=50µm.



Resim 42. Melatonin grubundaki bir rata ait periapikal bölgede TRAP ile immunohistokimyasal boyama, az sayıda hücrede pozitif immünreaksiyon (osteoklastlar=oklar), Streptoavidin biotin peroksidaz metodu, Bar=50 μ m.

5. TARTIŞMA

Apikal periodontitis pulpa enflamasyonunu takiben bakteriyel toksinlerin, enzimlerin ve zehirli metabolik ürünlerin veya direkt olarak kök kanalındaki bakterilerin periapikal dokulara girişi ile oluşmaktadır. Pulpa enflamasyonu yayıldıkça, enflamatuar medyatörler, periapikal dokuların fizyolojisini değiştirmeye başlamaktadır. IL-1, IL-11, IL-17 ve TNF- α gibi sitokinlerin etkisiyle farklılaşan ve aktifleşen (4) osteoklastlar kemik yıkımına sebep olmaktadır. Enflamatuar medyatörler ile osteoklast farklılaşmasını ve aktivasyonunu baskılayabilecek bir ajanın kullanılmasının periapikal dokularda meydana gelebilecek yıkımı azaltabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada melatoninin, ratlarda sistemik uygulanmasının deneysel periapikal lezyon oluşumu üzerine etkileri değerlendirilmiş ve melatoninin periapikal dokuda enflamasyonu baskıladığı, kemik yıkımını azalttığı, histopatolojik ve immünohistokimyasal yöntemlerle tespit edilmiştir.

5.1. Çalışmada Kullanılan Ajanın Seçimi

Literatürde periapikal lezyonlarda kemik yıkımının durdurulması veya azaltılması amacıyla, Tempol (280), Metformin (281), Zoledronik Asit (282), NC-2300 (283), Odanacatib (ODN) (284), Raloksifen (RLX) (285,286) gibi ajanların kullanıldığı çalışmalar mevcuttur. Tempol antioksidan özelliği ile lokal veya sistemik enflamasyon modellerinde doku yaralanmasını azaltmaktadır (287). Antihiperglisemik bir ajan olarak kullanılan metformin RANKL üzerindeki baskılayıcı etkisi ile osteoklast oluşumunu ve kemik yıkımını azaltırken aynı zamanda OPG salgılanmasını arttırmaktadır (288,289). Zoledronik asit osteoblastlar ve osteoklastları etkileyerek kemik dönüşümünü azaltan, kemik hastalıkları ve çeşitli tümörlerin kemik metastazlarında koruyucu ve tedavi edici olarak kullanılan bifosfonattır (290). Katepsin K osteoklastlardan yüksek miktarlarda salgılanan bir sistein proteazdır. NC-2300 ve odanacatib gibi katepsin K inhibitörleri bu enzimi baskılayarak kemik yıkımını engellemektedir (291). Raloksifen menapoz sonrası osteoporöz tedavisinde kullanılan bir çeşit selektif östrojen reseptör modülatörüdür

(SERM) (292). Osteoklastik aktiviteyi engellerken osteoblastik aktiviteyi uyarmaktadır (293).

Bu ajanların kemik metabolizması üzerindeki etkileri kanıtlanmış olsa da özellikle bifosfanatların gastrointestinal irritasyonlar, akut grip benzeri semptomlar, böbrek fonksiyonlarında bozukluklar, çene kemiklerinde osteonekroz, hipokalsemi, atipik trokanterik femur kırıkları gibi yan etkileri bulunmaktadır (294). Raloksifen kullanımının ven tromboembolisi ve inme riskindeki artış ile ilişkili olduğu bulunmuştur (295,296).

Melatoninin herhangi bir değişime uğramadan tüm fizyolojik bariyerlerden geçebilmesi ve tüm dokulara ulaşabilmesi (183), karaciğerde hızlı bir şekilde yıkılarak idrar ile atılması (197), serbest radikalleri temizleme özelliği (10-12), bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde rol alması (13,14), yaşlanma ve kanser üzerine olumlu etkileri (15-17), kemik yıkımını engellemesi (20,21) ve kemik yapımını arttırması (18,19) sebebiyle periapikal lezyonlardaki kemik yıkımına karşı güvenli bir şekilde kullanılabileceğini düşündürmektedir.

İlk olarak 1917 yılında keşfedilen ve 1958 yılında tanımlanan melatonin, çok geniş biyolojik etkileri sebebiyle uzun yılladır tıp alanında birçok çalışmada kullanılmıştır (17,20,175,183,193,205,212,236,242,297). Endodontide melatonin ile ilgili sadece bir çalışma bulunurken diş hekimliğinin diğer dallarında da sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Farklı dokularda antirezorptif etkilerinin değerlendirildiği melatoninin endodontide periapikal lezyonlar üzerine olası etkileri ilk olarak bu çalışma ile ortaya konulmuştur. Literatürde melatoninin kullanıldığı deneysel periapikal lezyon modeli oluşturulan herhangi bir hayvan çalışması bulunmamaktadır. Li ve ark. (2015) çalışmalarında deneysel pulpitis oluşturulan ratlarda IP 10 mg/kg melatonin uygulamasının pulpa enflamasyonuna karşı koruyucu etkisi olduğunu bildirmişlerdir (275). Bunun dışında periodontoloji alanındaki az sayıda çalışmada melatoninin 10 mg/kg'lık dozu tercih edilmiş ve olumlu etkileri bulunmuştur (253-255). Bu sebeple bizim çalışmamızda da melatonin 10 mg/kg olarak uygulanmıştır ve melatoninin doza bağlı etkisi ile ilgili bir inceleme yapılmamıştır.

5.2. Çalışmada Kullanılan Yöntemlerin Seçimi

Hayvan deneyleri insan ve hayvan hastalıkları hakkında bilgi edinmek, yeni bir maddeyi test etmek veya yeni cerrahi teknikleri denemek amacıyla bilime ve bilim insanlarına yardımcı olmaktadır (258). Endodontide rat (280,281,298-300), köpek (301,302), gelincik (303), kedi (276) ve fare (304,305) gibi deney hayvanlarında periapikal lezyon modelleri oluşturulan çok sayıda çalışma mevcuttur.

Ratların oral mikroflorası ile pulpa ve periodontal dokuları, insanların oral mikroflorası ile pulpa ve periodontal dokularına benzemektedir (306-308). Ayrıca kolay üreyebilmeleri, deney uygulamalarında kullanım ve bakım kolaylığı, ekonomik olması, evrim düzeyi yüksek diğer memelilerin kullanımını azaltması, kısa sürede genetik açıdan benzer grupların oluşturulabilmesi gibi pek çok yönden avantajlıdır (309,310). Bu gibi sebeplerle çalışmamızda periapikal lezyon modelinin oluşturulmasında ratlar tercih edilmiştir.

Ratların diş boyutları diğer deney hayvanlarına oranla oldukça küçük olduğu için literatürde yapılacak çalışma öncesinde pratik yapmanın, çalışmanın başarısını arttıracığı bildirilmiştir (309). Bu sebeple çalışma öncesinde el yeteneğinin geliştirilmesi amacı ile rat kadavrasında pratik uygulamalar yapıldı. Daha sonra 2 adet canlı hayvanda yapılan bir ön çalışma ile ratların azı dişlerinde pulpa ekspozunun uygulanabilirliği, konumu, derinliği ve 21 günün periapikal lezyon oluşumu açısından yeterliliği ve buna bağlı olarak ratların sakrifiye edilme zamanları belirlendi.

Ratlarda her yarım çenede 1 adet kesici diş ile 3 adet azı diş bulunmaktadır. Keser dişlerin sürekli olarak sürmesi apekslerinin açık olması gibi sebeplerle periapikal dokuların incelendiği ve periapikal lezyon modelinin oluşturulan çalışmalarda genellikle alt birinci büyük azı dişler tercih edilmektedir (280,281,298,299). Bu çalışmada da alt birinci büyükazı dişler; azı dişlerin periapikal lezyon modeline uygun olması, histolojik kesitlerde incelenmesinin kolay olması gibi nedenlerle kullanılmıştır. Rat azı dişlerine ulaşma zorluğu ve görüş açısının kısıtlı olması gibi olumsuz faktörlerin önüne geçmek için çalışmamızda dental presel modifiye edilerek özel ağız açma aletleri tasarlanmış ve geliştirilmiştir.

Literatürde periapikal lezyon modelinin oluşturulmasında genellikle benzer yöntemler kullanılmıştır. Birçok çalışmada azı dişlerin pulpalari ağız ortamına açılmış, kavitelere herhangi bir uyarın uygulanmadan deney süresince açık halde bırakılmıştır (280,281,298,299). Bazı çalışmalarda ise açılan kavitelere çeşitli endodontik patojen bakteri karışımı (*porphyromonas gingivalis*, *prevotella nigrescens*, *actinomyces viscosus*, *fusobacterium nucleatum*) yerleştirildikten sonra kaviterler ağız ortamına açık bırakılmıştır (304,305,311). Chuang ve ark, (2012) periapikal lezyon oluşturmak amacı ile kavite açtıktan sonra kök kanalına LPS yerleştirmiş ve kaviterleri güçlendirilmiş çinko oksit ojenol siman ile kapatmışlardır (312). Yaptığımız ön çalışmada herhangi bir uyarın olmadan kaviterlerin 21 gün boyunca ağız ortamına açık bırakılmasının periapikal lezyon oluşumunda yeterli olduğu görüldü. Ön çalışmadan elde edilen bulgular ve daha önce yapılmış birçok çalışma göz önünde bulundurularak bu çalışmada pozitif kontrol ve melatonin gruplarındaki ratların alt çene 1. büyük azı dişlerinin pulpalari okluzal yüzeylerde sınıf I kaviterler hazırlanarak ekspozite edildikten sonra kaviterler 21 gün boyunca ağız boşluğuna açık halde bırakıldı ve lezyon oluşumu sağlandı.

Birçok çalışmada periapikal lezyon oluşumu ve boyutları 7, 14, 21, 28, 35 ve 42 gün gibi farklı zamanlarda incelenmiş ve karşılaştırılmıştır. Liu ve ark, (2014) (313) lezyon boyutunun 0-28 günler arasında arttığını ve bu süreden sonra sabit kaldığını, Zhang ve ark, (2014) (314), 0-21 günler arasında lezyon boyutlarının arttığını, 21. ve 28. günlerdeki lezyon boyutları arasında anlamlı bir fark olmadığını bildirmiştir. Çalışmamızda periapikal lezyon oluşum süresi ile ilgili bir değerlendirme yapılması amaçlanmadığı için deney süresi Suzuki ve ark. (2015) çalışmalarındaki (283) gibi 21 gün olarak belirlenmiştir.

Pulpa enfeksiyonunu takiben meydana gelen periapikal lezyonlardaki kemik yıkım alanı radyografik tekniklerle tespit edilip değerlendirilebilmektedir. Daha önce yapılan birçok çalışmada ratlarda deneysel olarak oluşturulan periapikal lezyonların boyutları μ CT (282,299), fosfor plak (280,286) veya dijital sensör (312,315) kullanılarak radyografik olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmada periapikal lezyon boyutu ve piksel değerlerinin incelenmesinde dijital sensör (ProSensor, Planmeca OY, Helsinki, Finlandiya) kullanılmıştır. Chuang ve ark, (2012) LPS ile indüklenen pulpa enflamasyonu sonrası gelişen periapikal lezyonların radyografik ScanX (Air

Techniques, Melville, ABD) görüntü analiz programında değerlendirmişlerdir. Alt çene 1. büyük azı dişlerinin distal köklerindeki periapikal lezyon alanları önceden alanı bilinen bir standart ile programın kalibrasyonu yapıldıktan sonra mm² olarak hesaplanmıştır (312). Bu çalışmada benzer şekilde alt çene 1. büyükazı dişlerin mezial köklerindeki periapikal lezyonlara ait dijital görüntüler Image J (version 1.48, National Institute of Health, ABD) görüntü analiz programına aktarılarak, uzunluğu (mm) ve piksel değeri bilinen bir skala yardımı ile kalibrasyon yapılmış ve lezyon alanları hesaplanmıştır. Deneysel olarak oluşturulan periapikal lezyonların histopatolojik ve radyografik olarak değerlendirildiği başka bir çalışmada (316); radyografik görüntüler fosfor plaklar (PSP/ Digora-Soredex, Finlandiya) kullanılarak elde edilmiş ve lezyon boyutları ile lezyon bölgesinin piksel değerleri de Image J (version 1.33, National Institute of Health, ABD) programı kullanılarak hesaplanmıştır. Bu çalışmada da benzer şekilde piksel değerleri ölçülmüş ve gruplar arasındaki farklar karşılaştırılmıştır.

Periapikal lezyonlarda enflamasyon, kemik yıkımı ile ilişkili medyatörler ve hücreler, bakteri varlığı ve yerleşimi farklı yöntemler kullanılarak incelenebilmektedir. Bunlar; polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) (126), enzim bağlı immunosorbent deney (ELISA) (284), HE boyama ile histolojik inceleme (276) ve histomorfometri (304), immünohistokimya (285), TRAP boyama (285), Brown-Brenn boyama (317), gibi yöntemlerdir. PCR ve ELISA ile kantitatif sonuçlar elde edilebilse de incelenecek parametrelerin konumunu ve hücreler ile ilişkisini görmek mümkün olmamaktadır. Histopatolojide kantitatif sonuçlar elde etmek zor olsa da skorlama yöntemi kullanılmakta ve sonuçlar semi-kantitatif olarak değerlendirilebilmektedir. Ayrıca hücreler, bağ dokusu, kemik yıkım alanları, hiperemi, ödem veya apse varlığı yerinde incelenebilmektedir. Aynı şekilde immünohistokimya ile enflamasyon ve kemik yıkımında rol alan pek çok medyatör semikantitatif olarak yerinde tespit edilerek hangi hücrelerle ilişkili olduğu incelenebilmektedir ve farklı çalışmalarda bu yöntem kullanılmıştır (281,312).

Histomorfometri ile histolojik kesitlerden elde edilen görüntüler üzerinde periapikal bölgedeki kemik yıkım alanı hesaplanabilmektedir. Deneysel periapikal lezyon oluşturulan birçok çalışmada periapikal lezyon alanı ile ilgili histomorfometrik değerlendirmeler yapılmıştır (281,282,286,304,313,318). TRAP

boyama ile kemik yıkımdan sorumlu hücreler olan osteoklastlar boyanarak kemik yıkım alanındaki osteoklast varlığı, sayısı ve konumu incelenebilmektedir (313,314,317). Brown-Brenn boyama ile pulpa ve periapikal doku hastalıklarının esas etyolojik faktörü olan bakterilerin varlığı, kök kanalı ve periapikal lezyon içindeki konumu değerlendirilebilmektedir (317,319,320).

Histopatoloji, histomorfometri, immünohistokimya, TRAP boyama ve Brown-Brenn boyamanın avantajları göz önünde bulundurularak çalışmamızda enflamasyon ve kemik yıkımında rol alan medyatörler ile hücrelerin diş ve çevre dokulardaki varlığı, konumu ve miktarı, kemik yıkım alanının boyutu, ilgili diş ve çevre dokulardaki bakteri varlığı ve konumu bu yöntemler kullanılarak değerlendirildi.

5.3. Radyografik Bulguların Değerlendirilmesi

Literatürde melatoninin ratlarda deneysel olarak oluşturulan periapikal lezyon boyutları ve piksel değerleri üzerine etkilerinin radyografik teknikler ile araştırıldığı herhangi bir çalışma bulunmasa da periapikal kemik yıkımındaki etkileri araştırılan farklı ajanların kullanıldığı çalışmalar mevcuttur (280,282,284,286).

Wolle ve ark, (2012) antioksidan bir ajan olan Tempol'un kardiyomiyopati ve sağlıklı ratlarda deneysel periapikal lezyon oluşumu üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmada, radyografik değerlendirmeden elde edilen bulgulara göre; Tempol'un sistemik uygulanmasının periapikal lezyon alanlarında azalmaya yol açtığını bildirmişlerdir (280).

Başka bir çalışmada Gomes-Filho ve ark, (2015) ovaryumu çıkarılmış ratlarda raloksifen'in deneysel olarak oluşturulan periapikal lezyonlar üzerine etkilerini 7 ve 30 günlük sürelerde araştırmışlardır (286). Periapikal kemik yıkım alanı radyografik olarak değerlendirilmiş ve radyografik yoğunluğun 30. günde 7. güne göre daha düşük olduğunu, aynı zaman diliminde ise gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadığını bildirmişlerdir.

Melatoninin; Tempol gibi antioksidan özellikleri, raloksifen gibi antirezorptif etkileri olması ve radyografik değerlendirmeler açısından anlatılan çalışmalar ile benzer niteliktedir. Bu çalışmada da melatonin ratlarda deneysel periapikal lezyon

modellerinde kemik yıkımını radyografik olarak azaltmıştır. Fakat piksel değeri açısından deney grubu ve pozitif kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu bulgu üç boyutlu bir dokunun dijital radyografi ile iki boyuta indirgenmesi ve dijital periapikal radyografinin μ CT, CBCT gibi gelişmiş radyografik tekniklere göre dezavantajlarından (çözünürlük, densite vs) kaynaklanmış olabilir. Ayrıca incelenen dokunun çok küçük olması da değerlendirmelerin hassasiyeti etkileyebilir. Bu çalışmada periapikal lezyon boyutları histomorfometrik olarak da değerlendirilmiş ve radyografik bulgular pekiştirilmiştir.

5.4. Histopatolojik Bulguların Değerlendirilmesi

Literatürde farklı ajanların periapikal lezyon modellerindeki kemik yıkımı üzerine etkilerini histopatolojik olarak değerlendiren çalışmalar mevcuttur. Suzuki ve ark, (2015) Katepsin K inhibitörü olan NC-2300' ün periapikal kemik yıkımındaki rolünü değerlendirmeyi amaçladıkları çalışmalarında 21 gün sonunda hem deney grubu hem de pozitif kontrol grubunda kök çevresinde apse oluşumu ve çeşitli nötrofil ve makrofajların görüldüğünü bildirmişlerdir (283). Benzer şekilde bu çalışmada da pozitif kontrol ve melatonin gruplarında 21. gün sonunda periapikal dokularda çoğunluğunu nötrofil lökositlerin oluşturduğu ve mononükleer hücrelerin de bulunduğu yangısal hücre infiltrasyonları görülmüştür.

Aminoguanidin (AG)' in periapikal lezyonlardaki enflamatuvar cevap üzerine etkisinin histolojik olarak değerlendirildiği araştırmada AG'nin periapikal enflamasyonu anlamlı derecede azalttığı bildirilmiştir (276). AG'nin etkisi histolojik olarak alanında uzman bir patolog tarafından değerlendirilmiş ve başka bir yöntem kullanılmamıştır. Bu çalışmada ise histopatolojik değerlendirmelerin yanında, IL-1 β sitokini, kemik yıkımında önemli rolü olduğu bilinen RANK, RANKL ve OPG immunohistokimyasal tespit edilmiştir.

Sistemik olarak alınan melatoninin dental dokulardaki etkileri ile ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır. Periodontitis modeli oluşturulan diabetik ve sağlıklı ratlarda melatoninin sistemik uygulamasının oksidatif stres parametrelerinin biyokimyasal olarak, alveoler kemik kaybı üzerine etkilerinin histolojik olarak araştırıldığı bir çalışmada; melatoninin oksidatif stres indeksini ve alveoler kemik

kaybını azalttığı bildirilmiştir (254). Periodontitis modeli oluşturulan diabetik ve sağlıklı ratlarda melatoninin sistemik uygulamasının proenflamatuar sitokin seviyeleri, apoptoz ve lipid metabolizması üzerine etkilerinin biyokimyasal olarak değerlendirildiği, alveoler kemik kaybı üzerine etkilerinin ise histolojik olarak değerlendirildiği başka bir çalışmada; melatoninin osteoklastik aktiviteyi ve alveoler kemik kaybını azalttığı gösterilmiştir (253). Li ve ark, (2015)'nin sistemik melatoninin pulpitis üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmada (275); histolojik olarak pulpada meydana gelen hasarın melatonin uygulaması ile düzeltildiği ve meydana gelen nekrozun melatonin uygulanan deney grubunda diğer gruplardan düşük olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada da benzer şekilde histopatolojik olarak enflamasyon şiddeti karşılaştırıldığında, melatonin grubunun, pozitif kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde daha düşük skor değerleri aldığı görülmüştür.

5.5. Histomorfometrik Bulguların Değerlendirilmesi

Periapikal lezyonlar, enfekte kök kanallarındaki bakteriyel enfeksiyona karşı konak savunma yanıtı sonucu, periapikal enflamasyon ve kemik yıkımıyla tanımlanmaktadır (126). Periapikal lezyonlarda meydana gelen kemik yıkım alanı histopatolojik kesitlerden elde edilen dijital görüntüler üzerinde histomorfometrik analizler ile değerlendirilebilmektedir. Ratlarda, apikal periodontitis modelinde monosit kemotaktik protein (MCP)-1 ve reseptörü C-C kemokin reseptör 2 (CCR2) varlığı ve yerinin farklı yöntemler ile değerlendirildiği bir çalışmada, periapikal lezyon alanı 0, 7, 14, 21, 28 ve 35. günlerde histomorfometrik olarak ölçülmüştür. Lezyon alanının 0-28. günler arasında anlamlı derecede arttığı ve daha sonra stabil hale geldiği bildirilmiştir (313). Bu çalışmada histomorfometrik olarak 21. günde ölçülen lezyon alanı (0.9 mm^2) ile çalışmamızda pozitif kontrol grubunda elde edilen değer (1.3 mm^2) uyum göstermektedir. Aynı zamanda araştırmacıların 0. günde ölçtükleri lezyon alanı (0.1 mm^2) ile çalışmamızdaki negatif kontrol grubu değerleri (0.0 mm^2) benzerdir.

Silva ve ark, (2011) periapikal kemik yıkımında indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve fagosit oksidaz (PHOX) enzimlerinin rolünü araştırdıkları çalışmalarında; sağlıklı, iNOS ve PHOX eksikliği olan farelerden oluşan gruplarda periapikal kemik yıkım alanını histomorfometrik olarak değerlendirmişlerdir. Bu

çalışmada 14 günlük deney süresi sonunda sağlıklı farelerde periapikal lezyon oluşumu indüklenen ve indüklenmeyenler arasında lezyon alanları açısından anlamlı bir fark bulunmadığı bildirilmiştir (318). Bunun aksine çalışmamızda pozitif kontrol grubunda periapikal alanda lezyon oluşumu gözlenirken negatif kontrol grubunda lezyon oluşmamıştır. Bulgular arasındaki farklılık deney süresinin daha uzun olması (21 gün), incelenen dokunun daha büyük olması (deney hayvanı olarak ratların kullanılması) ile açıklanabilir.

Garlet ve ark, (2010) CCR2'nin farelerde periapikal lezyon gelişiminde, osteoklast farklılaşması ve uyarılmasında, enflamatuar osteoliz ilişkili meyatörlerin açığa çıkmasındaki rolünü araştırdıkları çalışmalarında; 3, 7, 14 ve 21 günlük sürelerde periapikal lezyon boyutunu histomorfometrik olarak değerlendirmişlerdir. Sağlıklı farelerde periapikal lezyon boyutu 3. ve 14. günler arasında artış gösterirken, 14. ve 21. günler arasında anlamlı bir fark olmadığı; CCR2 eksikliği bulunan farelerde 7. ve 21. günlerde sağlıklı fareler ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede daha büyük lezyonların görüldüğü bildirilmiştir (304). Çalışmamızda da melatonin grubunda, pozitif kontrol grubuna göre periapikal lezyon boyutlarının daha küçük olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda CCR2'nin osteoklast öncülerinin kemoatraksiyonu ve osteoklast farklılaşması ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (321,322). Benzer şekilde melatonin de osteoklast farklılaşması ve oluşumunda rol oynamaktadır ve bu açıdan Garlet ve ark, (2010)'nın bulguları ile çalışmamız bulguları paralellik göstermektedir.

5.6. Brown-Brenn Boyama Bulgularının Değerlendirilmesi

Bakteri ve bakteri ürünlerinin invazyonu pulpa dokusunda enflamatuar reaksiyonu uyarmakta ve kontrol altına alınmazsa periapikal dokularda kronik enfeksiyona yol açmaktadır (22). Bu süreç, kök ucunda osteolitik lezyon oluşumu ile sonuçlanan doğal ve kazanılmış bağışıklık hücrelerinin uyarılması ve toplanmasını içeren bir dizi enflamatuar cevaptır (1,323). Brown-Brenn boyama (277), bakterilerin diş kronu, kök kanal sistemi ve periapikal dokulardaki yeri ve varlığını değerlendirmek için kullanılmaktadır (279,317,319,320).

TLR2 eksikliğinin farelerde periapikal lezyonların oluşunu ve ilerleyişi üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada (317); bakteri varlığı ve yeri Brown-Brenn boyama yöntemi ile değerlendirilmiştir ve bakteri penetrasyonu De Rossi ve ark, (2008)'nın geliştirdiği skorum sistemi modifiye edilerek gösterilmiştir. Deneysel periapikal lezyon oluşturulan tüm örneklere kök kanal sisteminde bakterilere rastlandığı, sağlıklı kontrol grubu ile TLR2 eksikliği bulunan deney grubu arasında anlamlı bir fark bulunmadığı, özellikle diş kronu ile kökün koronal ulsnde daha fazla bakteri olduğu ve hiçbir örnekte periapikal lezyon içerisinde bakteriye rastlanmadığı bildirilmiştir (317). Bu araştırma ile aynı yöntemleri kullanarak IL-22 eksikliğinin etkilerini değerlendiren De Oliveira ve ark, (2015), Brown-Brenn boyama ile sağlıklı kontrol grubu ile IL-22 eksikliği olan farelerden oluşan deney grubu arasında anlamlı bir fark bulunmadığını bildirmişlerdir (319).

Myeloid farklılaşma primer cevap geni (MyD88) eksikliğinin farelerde periapikal lezyonların oluşunu ve ilerleyişi üzerine etkilerinin araştırıldığı benzeri bir çalışmada (320) bakteri varlığı ve yeri Brown-Brenn boyama yöntemi kullanılarak ve aynı skorum sistemi ile değerlendirilmiştir. Sağlıklı farelerden oluşan kontrol grubunda, diş kronunda ve kökün koronal ulsnde daha fazla bakteri bulunduğu ve periapikal lezyon içerisinde bakteriye rastlanmadığı bildirilmiştir. MyD88 eksikliği olan farelerden oluşan grupta ise kontrol grubunun aksine mikrobiyal enfeksiyonun periapikal bölge ve lezyona kadar uzandığı bildirilmiştir. Apikal ul, sement lakünleri ve periapikal lezyon içerisinde bakterilere rastlandığı ve iki grup arasında ortaya çıkan anlamlı farkın, MyD88 eksikliğinde konak direnci ve enfeksiyon ile savaş kabiliyetinin azalmasından kaynaklanabileceği bildirilmiştir (320). Bu çalışmada da yukarıda bahsedilen çalışmalarda kullanılan skorum sistemi kullanılmış, Brown-Brenn boyama sonucu periapikal lezyon oluşturulan tüm gruplarda bütün örneklere bakteri varlığı gözlenmiş ve genellikle kron ve kök içerisinde yoğun bakteri kümelerine rastlanmıştır. Pozitif kontrol grubunda tüm diş kesitlerinde, özellikle kron ve kök pulpasında yaygın şekilde bakteri kümeleri dikkati çekerken, periapikal lezyonun içerisinde bazı alanlarda değişik yoğunluklarda bakteri kümeleri gözlenmiştir. Melatonin grubunda ise kron ve kök pulpasında pozitif kontrol grubuna göre daha az

yoğunlukta bakteri kümeleri gözlenmiş, periapikal lezyon içerisinde sadece birkaç ratta nötrofillerce fagosite edilmiş bakterilere rastlanmıştır.

Literatürde melatoninin deneysel periapikal lezyon modellerinde bakteri varlığı ve yerleşimine etkisini değerlendiren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Fakat melatoninin; TLR2, IL-22 ve MyD88 gibi konak savunma yanıtında önemli rolü olduğu bilinmektedir. TLR2, IL-22 ve MyD88 eksikliğinin negatif etkileri araştırmalarda gösterilmiş, bu çalışmada melatonin uygulamasının pozitif etkileri değerlendirilmiş ve melatoninin ratlarda deneysel olarak oluşturulan periapikal lezyonlarda bakteri varlığı ve yerleşimini etkilediği Brown-Brenn boyama yöntemi ile kanıtlanmıştır.

5.7. IL-1 β için İmmünohistokimyasal Bulguların Değerlendirilmesi

IL-1 β , IL-1'in alt gruplarından bir tanesidir. Bazı çalışmalarda, periapikal lezyonlarda en sık IL-1 β formunun tespit edildiği bildirilmiştir (119-122). IL-1 β , T lenfositlerin uyarılmasında ve lenfosit üretiminde, B lenfositlerin çoğalması ve antikor üretiminde, fibroblastların çoğalmasında, monosit ve fibroblastlardan PGE₂ üretiminin uyarılmasında rol oynar (324,325). Nötrofillerin kemotaksisi, etkinleştirilmesi ve endotel hücrelerinin işlevlerine etki etmektedir (326,327). Periapikal lezyonların ilerlemesi IL-1 β , TNF- α ve RANKL tarafından uyarılan kemik rezorpsiyonuna bağlıdır (126,328).

Stashenko (1990), özellikle periradiküler seviyedeki IL-1'in osteoklast aktivasyonu üzerine etkisinden dolayı potansiyel bir kemik yıkım medyatörü olduğunu ve bu sebeple periradiküler lezyonların patogeneğinde önemli rol oynadığını bildirmiştir (112). Başka bir çalışmada insan apikal periodontitis lezyonlarından elde edilen bakteri ve endotoksin ile uyarılan kültür ortamındaki makrofajlardan salgılanan IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10 ve PGE₂ seviyeleri ELISA ve PCR yöntemi kullanılarak değerlendirilmiş ve tüm kültürlerde IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10 ve PGE₂'nin bulunduğu bildirilmiştir (329).

Kawashima ve ark, (2007) ratlarda deneysel olarak oluşturulan periapikal lezyonlarda RANKL, RANK, OPG ve IL-1 β , IL-1 α , IL-10, TNF- α sitokinlerinin mRNA ekspresyonlarını real-time PCR ile değerlendirdikleri çalışmalarında IL-1 β ,

IL-1 α ve TNF- α ekspresyonunun sağlıklı periapikal dokularda görüldüğünü ancak seviyelerinin periapikal lezyon oluşumunun indüklenmesinden 2 hafta sonra sert bir şekilde yükseldiğini göstermişlerdir (126). IL-1 α ve TNF- α ekspresyonlarının 3. haftada, IL-1 β ekspresyonlarının ise 4. haftada en yüksek seviyede olduğunu bildirmişlerdir (126). Bu çalışmada immunohistokimyasal olarak sağlıklı periapikal dokularda bir miktar IL-1 β reaksiyonu görülürken, lezyon tetiklenmesinden 3 hafta sonra IL-1 β immun reaksiyonu anlamlı derecede artış göstermiştir. Çalışmamızda süre bazında bir değerlendirme yapılmadığı için IL-1 β seviyesinin hangi haftada en yüksek seviyeye ulaştığı ile ilgili bir yargıya varılamamaktadır.

Silva ve ark, (2011) periapikal kemik yıkımında iNOS ve PHOX enzimlerinin rolünü araştırdıkları çalışmalarında; IL-1 β , TNF- α , RANK, RANKL, OPG ve MCP-1 mRNA ekspresyonunu gerçek zamanlı PCR ile değerlendirmişlerdir. IL-1 β , TNF- α , RANK, RANKL ve MCP-1 deneysel periapikal lezyon oluşturulan tüm gruplarda artış göstermiştir (318). Çalışmamızda IL-1 in alt gruplarından birisi olan IL-1 β 'nin deneysel periapikal lezyondaki varlığı, konumu ve miktarı immunohistokimyasal olarak değerlendirilmiştir. Deneysel periapikal lezyon oluşturulan pozitif kontrol ve deney grubunda IL-1 β (+) hücre yoğunluğunun herhangi bir işlem uygulanmayan negatif kontrol grubundan daha fazla olduğu izlenmiştir.

Endodontide melatoninin etkilerinin araştırıldığı tek çalışmada Li ve ark. (2015) ratlarda deneysel akut pulpitis modelinde ve insan pulpası hücre kültüründe TLR4, nükleer faktör kappa B (NF- κ B), IL-1 β , IL-18 ve TNF- α değerlerini izlemişlerdir (275). Pulpa yaralanmasının 5 günlük süreçte akut pulpa enflamasyonu ve pulpa nekrozuna sebep olduğunu ve serum IL-1 β , IL-18 ve TNF- α değerlerini anlamlı derecede arttırdığını, sistemik melatonin uygulamasının serumdaki sitokinlerin artışını ve pulpa nekroz oranını baskıladığını bildirmişlerdir. Deney başlangıcı ile karşılaştırıldığında akut pulpitisli ratların pulpasındaki TLR4, NF- κ B, IL-1 β , ve TNF- α miktarının arttığını, melatoninin IL-1 β , ve TNF- α üretimini azalttığı gibi TLR4, NF- κ B'yi de azalttığını göstermişlerdir. Bu çalışma deneysel pulpitis modeli kullanılarak pulpadaki proenflamatuar sitokinlerin incelenmesi, melatoninin pulpa dokusundaki etkilerinin değerlendirmesi açısından çalışmamızla benzerdir. Çalışmamızda sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında deneysel periapikal lezyon modellerinde IL-1 β (+) hücre yoğunluğunun daha fazla olduğu ve

melatoninin IL-1 β salgılanmasını baskıladığı immünohistokimyasal olarak gösterilmiştir.

5.8. RANK, RANKL ve OPG için İmmünohistokimyasal Bulguların Değerlendirilmesi

TNF ligand ve reseptör ailesinin üyeleri olan RANKL (5,6), reseptörü RANK (7) ve doğal antegonisti OPG (8,9)'nin keşfedilmesi osteoklastların farklılaşması ve işlevlerinin nasıl düzenlendiği konusunu aydınlığa kavuşturmuştur. Bu üç molekül kemik yapım ve yıkımında, osteoklast ve osteoklast öncüllerinin farklılaşması, aktivasyonu ve yaşamı için anahtar düzenleyicilerdir (5,6,9). "*Osteoclast differentiation factor*" (ODF), "*osteoprotegerin ligand*" (OPGL) veya "*TNF-related activation induced cytokine*" (TRANCE) olarak da bilinen RANKL, osteoklastogenezin uyarılmasında en önemli faktördür ve çalışmalarda RANKL'dan yoksun fareler osteopetrotik fenotip göstermiştir (330).

Menezes ve ark, (2006) periapikal kist ve granülomlarda RANKL varlığını göstermiş ve periapikal lezyon gelişimine katıldığını bildirmişlerdir (331). Sabeti ve ark, (2005) RANKL'ın kemik rezorpsiyonunu indükleyerek apikal periodontitislerde rol oynadığını rapor etmişlerdir (332). Osteoklast oluşumu "*Osteoclastogenesis inhibitory factor*" (OCIF) olarak da bilinen OPG ve RANKL arasındaki denge ile düzenlenmektedir (333).

Kawashima ve ark, (2007) rat periapikal lezyonlarında RANKL, RANK, OPG ve IL-1 β , IL-1 α , IL-10, TNF- α sitokinlerinin mRNA ekspresyonlarını gerçek zamanlı PCR ile değerlendirdikleri çalışmalarında RANKL ekspresyonunun sağlıklı periapikal dokularda görüldüğünü bildirmişlerdir. RANKL seviyesinin lezyon tetiklemesinden 1 hafta sonraya kadar aynı seviyede kaldığını, 2 hafta sonra ise anlamlı derecede arttığını ve 3 hafta sonra en yüksek seviyeye ulaştığını göstermişlerdir. RANK ve OPG deki değişimin de RANKL ile benzer olduğunu ve RANKL/OPG oranının ise 2. ve 3. haftalarda arttığını bildirmişlerdir (126). Bu çalışmada da sağlıklı negatif kontrol grubu örneklerinde RANKL, RANK, OPG (+) hücre yoğunluğunun, periapikal lezyon oluşumu indüklenen pozitif kontrol ve deney grubu örneklerinden istatistik olarak daha az olduğu bulunmuştur.

Çalışmamızda süre bazında bir değerlendirme yapılmadığı için RANKL, RANK ve OPG seviyesinin hangi haftada en yüksek seviyeye ulaştığı ile ilgili bir yargıya varılamamaktadır.

LPS ile indüklenen periapikal lezyonlarda RANKL ve OPG değerleri, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8. haftalarda PCR ve immunohistokimyasal yöntemler kullanılarak takip edilmiştir (312). RANKL mRNA ekspresyonu negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 1. ve 2. haftalarda anlamlı derecede daha düşük, 7 ve 8. haftalarda anlamlı derecede daha yüksek bulunmuş, 3, 4, 5 ve 6. haftalarda ise anlamlı bir fark bulunmadığı bildirilmiştir. OPG mRNA ekspresyonu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tüm haftalarda dalgalı bir seyir izlemiş ve anlamlı derecede daha düşük bulunmuştur. İmmünohistokimyasal değerlendirmede; kontrol grubunda sağlıklı dokularda çok az miktarda RANKL ve OPG (+) hücre olduğu, 3-8 haftalar arasında RANKL ve OPG (+) hücre miktarının arttığı gösterilmiştir. Bazı gruplarda kesitlerin boyama işleminde ortaya çıkan problem sebebiyle RANKL ve OPG aktivitesinin değerlendirilemediği bildirilmiştir (312). Bu çalışma ile benzer şekilde çalışmamızda immunohistokimyasal olarak kontrol grubunda sağlıklı dokularda daha az yoğunlukta RANKL ve OPG (+) hücre tespit edilirken, 21. günde pozitif kontrol grubundaki RANKL ve OPG (+) hücre yoğunluğunun anlamlı derecede daha fazla olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte çalışmamızda RANK (+) hücre yoğunluğu da değerlendirilmiş ve kontrol grubunda sağlıklı dokularda daha az yoğunlukta RANK (+) hücre tespit edilirken, 21. günde pozitif kontrol grubundaki RANK (+) hücre yoğunluğu anlamlı derecede daha fazla bulunmuştur. Ayrıca immunohistokimyasal boyamalar herhangi bir problem ile karşılaşılmadan tüm kesitlerde başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

Melatoninin; dolaylı olarak antioksidan, direkt olarak serbest radikal temizleme ve RANKL üzerindeki baskılayıcı etkileri yoluyla osteoklastların etkinliğini ve bu sayede kemik yıkımını azalttığı bilinmektedir (19-21,247). Fakat melatoninin periapikal lezyonlarda kemik yıkımı üzerindeki etkilerinin RANK, RANKL ve OPG'nin değerlendirilmesi yolu ile araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Bu durum çalışmamızın özgünlüğünü ortaya koymaktadır.

Melatonin dışındaki bazı ajanların RANK, RANKL ve OPG seviyelerine etkilerinin immunohistokimyasal olarak değerlendirildiği çalışmalar mevcuttur (281,285). Bir çalışmada metforminin ratlarda deneysel olarak oluşturulan periapikal lezyon ve RANKL/OPG oranı üzerindeki etkileri 14. ve 28. günlerde, histoloji, enzim histokimyası, immunohistokimya ve immunoflorosan yöntemleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Periapikal alanda 14. ve 28. günlerde RANKL (+) ve OPG (+) hücrelerin açık olarak görüldüğü, 14. günde metformin ile tedavi edilen grupta RANKL (+) hücre sayısının kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha düşük bulunduğu, diğer yandan metformin ile tedavi edilen grupta 28. günde OPG (+) hücre sayısının kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunduğu bildirilmiştir. Sonuç olarak metforminin periapikal lezyonlarda osteoklast sayısını ve kemik yıkımını azalttığı ve bu etkinin RANKL/OPG yolu üzerinden gerçekleştiği gösterilmiştir (281). Bu çalışmada negatif kontrol grubuna yer verilmemiş ve bu sebeple sağlıklı periapikal dokular üzerinde değerlendirme ve karşılaştırma yapılmamıştır. Çalışmamızda ise negatif kontrol, pozitif kontrol ve melatonin tedavisi uygulanan üç grupta değerlendirmeler yapılmıştır. Melatonin ile tedavi edilen grupta RANKL (+) hücre yoğunluğunun pozitif kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha az olduğu, negatif kontrol grubuyla anlamlı bir fark bulunmadığı tespit edilmiştir. Melatonin grubunda OPG (+) hücre yoğunluğu pozitif kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha fazla bulunmuştur.

Gomes-Filho ve ark, (2015) östrojen eksikliği olan ratlarda ralokxifene tedavisinin periapikal lezyon gelişimindeki osteoklastogenez ve anjiyogenezin lokal düzenleyici mekanizmalarını araştırdıkları çalışmada; RANKL ve OPG'yi immunohistokimyasal olarak değerlendirmişlerdir. Sağlıklı ve tedavi uygulanmayan, östrojen eksikliği ve raloksifen tedavisi uygulanan gruplar ile karşılaştırıldığında en fazla RANKL immun reaksiyonunun östrojen eksikliği ve tedavi uygulanmayan grupta tespit edildiği bildirilmiştir. OPG immunreaksiyonu tüm gruplarda benzer bulunmuş ve sonuçta raloksifen tedavisinin ratlarda periapikal lezyon gelişiminde östrojen eksikliğine bağlı osteoklastogenez ve anjiyogenezdeki lokal düzenleyicilerin artışı tersine çevirdiği gösterilmiştir (285). Benzer şekilde çalışmamızda da melatoninin ratlarda deneysel periapikal lezyon gelişimindeki kemik yıkımının lokal

düzenleyicileri olan RANKL ve RANK değerlerini azalttığı OPG değerlerini ise arttırdığı immünohistokimyasal olarak gösterilmiştir.

5.9. TRAP Bulgularının Değerlendirilmesi

Periapikal hastalıklarda kemik yıkımında çeşitli enflamatuvar medyatörler ve hücrel mekanizmalar rol oynamaktadır. Bu süreçte özellikle kemik yıkımının hücrel mekanizmalarında en önemli rolün osteoklastlara ait olduğu bilinmektedir (77). Osteoklastlar GM-CSF, RANKL aktivitesi ile monosit/makrofaj kökenli hücrelerden farklılaşmaktadır (334). Bunun yanında OPG, IL-1, IL-6, TNF, prostoglandinler, bradikinin, kallidin ve trombin gibi birçok sitokin ve büyüme faktörünün osteoklast farklılaşmasında etkili olduğu gösterilmiştir (136-140). Olgun osteoklastlar, osteoblastların salgıladıkları kemotaktik faktörlerin etkisi ile mineralize kemik yüzeyine tutunduktan sonra proteolitik lizozomal enzimler ve karbonik anhidraz salgılayarak kemikteki mineralize ve mineralize olmayan yapıları çözmektedir (137,143-145). Osteoklast farklılaşması TRAP, kalsitonin reseptör, katepsin K gibi kodlanan genlerin ekspresyonu ile ilişkili bulunmuştur (335). TRAP osteoklastlara özgü biyokimyasal bir belirteç olarak kabul edilmektedir (336). Çalışmamızda TRAP boyama immünohistokimyasal olarak uygulanmış ve TRAP (+) hücreler osteoklast olarak değerlendirilmiştir.

TRAP boyama kemik yıkım alanındaki osteoklast varlığı, sayısı ve konumunun belirlenmesinde birçok çalışmada kullanılmıştır (313,314,317). Chuang ve ark, (2012) (312) LPS ile indüklenen rat periapikal lezyonlarında periapikal bölgedeki osteoklastları TRAP boyama (enzim histokimya) ile belirlemişlerdir. Sağlıklı ve periapikal lezyonlu dokulardan 1 ve 2 haftalık süreçlerde elde edilen kesitlerde az miktarda osteoklast benzeri hücreye rastlandığını, osteoklast benzeri hücre sayısında 3. haftadan 8. haftaya kadar artış görüldüğü bildirilmiştir (312). Benzer şekilde bu çalışmada da negatif kontrol grubunda sağlıklı periapikal dokularda az sayıda osteoklast tespit edilmiş, periapikal lezyon oluşturulan pozitif kontrol grubunda ise 21. günde osteoklast sayısının anlamlı derecede daha fazla olduğu bulunmuştur.

Melatonin dolaylı antioksidan etkisi ve direkt serbest radikal temizleme etkisi yoluyla osteoklastların etkinliğini geciktirmektedir ve böylece kemik yıkımını

azaltmaktadır (20,21). Melatonin doza bağılı olarak kemik iliği hücrelerinden çoğalan osteoklastların oluşturduğu rezorpsiyon alanlarını ve sayısını azaltmaktadır. Çalışmalarda melatoninin doza bağılı olarak kemik rezorpsiyonu ile ilgili değişkenleri (osteoklast sayısı, osteoklast yüzeyi/kemik yüzeyi) belirgin bir şekilde azalttığı gösterilmiştir (21). Melatoninin deneysel periapikal lezyonlarda osteoklastlar üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Bazı çalışmalarda benzer etkileri bulunan çeşitli ajanların periapikal lezyonlardaki osteoklastlar üzerine etkileri TRAP boyama ile değerlendirilmiştir (283,284).

Hao ve ark, (2015) farelerde oluşturulan periapikal lezyonlarda katepsin K inhibitörü olan odanacatibin osteoklastlara olan etkilerini 7, 21 ve 42. günlerde TRAP boyama kullanarak araştırmışlardır (284). Periapikal lezyon oluşturulan ve herhangi bir tedavi uygulanmayan grup ile odanacatib uygulanan grup karşılaştırıldığında tüm günlerde anlamlı derecede daha fazla osteoklast görülmüştür. Suzuki ve ark, (2015) başka bir katepsin K inhibitörü olan NC-2300'ün ratlarda periapikal enflamasyon ve kemik yıkımı üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmada; 21 günlük deney süresi sonunda lezyon oluşturulan ve NC-2300 uygulanan deney grubunda TRAP (+) hücre sayısının lezyon oluşturulan ve herhangi bir ilaç uygulanmayan pozitif kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha az olduğunu bildirmişlerdir (283). Bu çalışmalardan farklı olarak bizim çalışmamızda TRAP boyama yönteminde enzim histokimyası yerine immünohistokimya yöntemi kullanılmış fakat osteoklastlar semikantitatif olarak değil 40X büyütmede 5 ayrı alanda sayılarak değerlendirilmiştir.

İmmünohistokimyasal TRAP tekniğinin osteoklastlar için yüksek oranda spesifik olduğu Gomes-Filho ve ark, (2015) tarafından bildirilmiştir (286). Gomes-Filho ve ark, (2015) ovaryumu çıkarılmış ratlarda raloksifen' in periapikal lezyon üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmada, osteoklastları immünohistokimyasal TRAP yöntemini kullanarak değerlendirmişlerdir (286). Ovaryumu çıkarılmış ve herhangi bir tedavi uygulanmayan grupta TRAP (+) hücre sayısı, sağlıklı ve tedavi uygulanmayan grup ile ovaryumu çıkarılmış raloksifen tedavisi uygulanan gruptan daha yüksek bulunmuştur (286). Anlatılan çalışmalara paralel olarak bizim çalışmamızda pozitif kontrol grubundaki TRAP (+) hücre sayısı melatonin uygulanan gruba göre anlamlı derecede daha fazladır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmanın sınırları dâhilinde elde edilen sonuç ve öneriler aşağıda sunulmuştur.

1. Bu çalışmada, periapikal lezyon oluşturulması amacı ile rat 1. azı dişlerinde oklüzal yüzde kaviterler açılarak deney süresince ağız ortamına açık bırakıldı. Yirmi bir günlük deney süresi sonunda sakrifiye edilen ratlardan elde edilen örnekler değerlendirildiğinde radyografik ve histolojik olarak periapikal lezyonun olduğu tespit edildi. Tüm örneklerde periapikal lezyonun radyografik ve histolojik olarak izlenmesi bu modelin standardizasyonunu ve deneyin tekrarlanabilirliğini göstermektedir.

2. Rat azı dişleri oklüzal yüzeyde pulpayı içeren kaviterlerin açılmasına imkân tanınması, kök kanal girişlerinin kontrol edilebilirliği, radyografik ve histolojik değerlendirmelerin kolay olaması gibi sebeplerden dolayı deneysel periapikal lezyon modellerinde tercih edilebilir. Rat azı dişlerinde manipülasyon zorluğu ve görüş açısının kısıtlı olması gibi olumsuz faktörlerin önüne geçmek için çalışmamızda da olduğu gibi özel ağız açma apareyleri tasarlanıp, geliştirilebilir.

3. Farklı dokularda antirezortif özellikleri gösterilmiş melatoninin periapikal dokuda kemik yıkımını azalttığı radyografik, histopatolojik, histomorfometrik olarak ilk defa bu çalışma ile gösterildi. Periapikal lezyon oluşumunun indüklendiği ve melatoninin sistemik uygulandığı ratlarda 21. günün sonunda melatonin uygulanmayan ratlara göre periapikal lezyon alanının daha küçük olduğu radyografik ve histomorfometrik olarak tespit edildi ($p<0,01$).

4. Rat azı dişlerinde pulpayı içeren oklüzal kaviterlerin ağız ortamına açılması sonucu 21. günde dişlerin periapikal dokularında çoğunluğunu nötrofil lökositlerin oluşturduğu ve mononükleer hücrelerin de bulunduğu yangısal hücre infiltrasyonu ile karakterize periapikal lezyonların varlığı histolojik olarak izlendi. Periapikal lezyon oluşumunun indüklendiği ve melatoninin sistemik uygulandığı ratlarda ise daha az sayıda yangısal hücre infiltrasyonu gözlemlendi, enflamasyon skorlarının pozitif kontrol grubuna göre daha düşük olduğu tespit edildi ($p<0,01$). Bu sonuç melatoninin periapikal dokuda antienflamatuvar etkilerini göstermektedir.

5. Yirmi bir gün süre ile pulpayı içeren oklüzal kavitelerin ağız ortamına açık bırakıldığı tüm örneklerde kron ve kök kanal sistemi ve periapikal lezyon içerisinde yoğun miktarda gram (+) ve gram (-) basil ve kok mikroorganizma varlığı Brown-Brenn boyama ile tespit edildi. Bu durum periapikal lezyon oluşumunda mikroorganizmaların rolünü göstermektedir.

6. Periapikal lezyon oluşumu indüklenmiş ve sistemik melatonin uygulanan örneklerde pozitif kontrol grubuna göre kron dan periapikal dokulara doğru bakteri penetrasyonunun daha az olduğu izlendi. Farklı dokularda mikroorganizmalara karşı konak doku direncini arttırdığı bilinen melatoninin diş ve çevre dokularında da mikroorganizma ilerleyişini engellediği bu çalışma ile gösterilmiştir.

7. Osteoklast aktivasyonu üzerine etkisinden dolayı potansiyel bir kemik yıkım medyatörü olduğu bilinen IL-1 β periapikal lezyon oluşumu indüklenmiş tüm örneklerde sağlıklı periapikal dokudan elde edilen örneklere oranla daha yüksek seviyede bulundu ($p < 0,01$). Bu IL-1 β 'nin periradiküler lezyonların patogeneğinde önemli rol oynadığını desteklemektedir. Melatonin uygulanan örneklerde IL-1 β (+) hücre yoğunluğu pozitif kontrol grubuna göre daha az bulundu ($p < 0,01$). IL-1 β 'nin melatonin uygulaması ile baskılanması melatoninin antiinflamatuar ve antirezorptif etkilerini göstermektedir.

8. Periapikal lezyon indüksiyonunun ratlarda 21. günde periapikal dokuda RANK (+) hücre yoğunluğunda artışa sebep olduğu immünohistokimyasal olarak tespit edildi ($p < 0,01$). Sistemik melatonin uygulanan ve sağlıklı dokudan elde edilen örneklerde RANK (+) hücre yoğunluğu benzerdi ($p > 0,05$). Melatonin osteoklast farklılaşması ve aktivasyonu ile ilişkilendirilen RANK üretimini azaltmıştır.

9. Periapikal lezyon indüksiyonunun ratlarda 21. günde periapikal dokularda RANKL (+) hücre yoğunluğunda artışa sebep olduğu immünohistokimyasal olarak tespit edildi ($p < 0,01$). Sistemik melatonin uygulanan ve sağlıklı dokudan elde edilen örneklerde RANKL (+) hücre yoğunluğu benzerdi ($p > 0,05$). Kemik yıkımının uyarılmasından sorumlu olan RANKL'in sistemik melatonin uygulaması ile baskılandığı bu çalışma ile gösterilmiştir.

10. Periapikal lezyon oluşumunun indüklendiği tüm örneklerde OPG (+) hücre yoğunluğunun sağlıklı dokuya göre daha fazla olduğu immünohistokimyasal

olarak izlendi ($p<0,01$). Bu durum kemik yıkım faaliyetleri ile birlikte yıkımı durdurucu faaliyetlerin birarada yürüdüğünü göstermektedir. Sistemik melatonin uygulanan örneklerde OPG (+) hücre yoğunluğu pozitif kontrol grubundan daha yüksek bulundu ($p<0,01$). Osteolitik faaliyeti engelleyen OPG'nin sistemik melatonin uygulaması ile periapikal dokuda arttığı ilk olarak bu çalışma ile gösterilmiştir.

11. Bu çalışmada deneysel periapikal lezyonlarda osteoklastların farklılaşması aktivasyonu ve yaşamı için anahtar düzenleyiciler olan RANK, RANKL, OPG'nin 21 gün sonundaki yoğunlukları ve bunlara melatoninin etkisi değerlendirilmiştir. Bu düzenleyicilerin haftalar içindeki değişimleri ve lezyon büyüklüğünün stabil hale geldiği haftalardaki miktarlarının değerlendirildiği daha uzun süreli çalışmalara ihtiyaç vardır.

12. Periapikal lezyon indüksiyonunun ratlarda 21. günde periapikal dokularda osteoklast sayısında artışa sebep olduğu immünohistokimyasal TRAP boyama ile tespit edildi ($p<0,01$). Sistemik melatonin uygulanan örneklerde ise osteoklast sayısı pozitif kontrol grubundan daha az bulundu ($p<0,01$). Sistemik melatonin uygulaması periapikal kemik yıkımı bölgesinde osteoklast sayısını azaltmıştır.

13. Bu çalışmada sistemik melatoninin apikal kemik yıkımına olası etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Periapikal kemik lezyonlarında melatoninin lokal uygulama yöntemlerinin ve etkilerinin incelendiği ilave araştırmalara ihtiyaç vardır.

14. İleriki dönemde periapikal lezyonların iyileşmesinde sistemik ve lokal uygulanan melatoninin kemik yapım hızı ve kalitesi üzerine etkilerinin araştırılması planlanmaktadır.

ÖZET

Melatoninin Deneysel Olarak Oluşturulan Periapikal Lezyonlar Üzerine Etkisi

Amaç: Bu çalışmanın amacı; melatoninin ratlarda sistemik uygulamasının deneysel periapikal lezyon oluşumu üzerine olası etkilerinin araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem: 30 adet Sprague-Dawley rat negatif kontrol, pozitif kontrol ve melatonin grubu olarak rasgele 3 gruba ayrıldı. Periapikal lezyon indüksiyonu için pozitif kontrol ve melatonin grubundaki ratların alt çene 1. büyük azı dişlerinin pulparları ağız ortamına açıldı. Melatonin grubundaki ratlara günlük olarak IP 10mg/kg melatonin uygulanırken negatif kontrol ve pozitif kontrol grubundaki ratlara IP %10'luk etanol taşıyıcı uygulandı. Yirmi bir gün sonunda ratlar sakrifiye edildi. Periapikal lezyon alanı radyografik ve histomorfometrik, enflamasyon şiddeti histopatolojik olarak değerlendirildi. Brown-Brenn boyama ile diş ve periapikal dokulardaki bakteri varlığı ve yeri belirlendi. İmmünohistokimyasal yöntemler ile IL-1 β , RANK, RANKL ve OPG (+) hücre yoğunluğu skorlandı. İmmünohistokimyasal TRAP boyama ile osteoklast sayıları hesaplandı. Parametrik olmayan veriler Bonferroni Dunn testini takiben Kruskall-Wallis ile parametrik veriler ise Tukey testini takiben ANOVA ile analiz edildi (p=0,05).

Bulgular: Radyografik değerlendirmelerde melatonin grubundaki lezyon boyutlarının pozitif kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha küçük olduğu (p<0,01), piksel değeri açısından ise iki grup arasında anlamlı derecede fark olmadığı bulundu (p>0,05). Histopatolojik değerlendirmelerde, melatonin grubundaki periapikal enflamasyon skor değerleri pozitif kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha düşüktü (p<0,01). Histomorfometrik ölçümlerde melatonin grubunda, pozitif kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha küçük periapikal lezyonlar olduğu tespit edildi (p<0,01). Brown-Brenn boyama ile pozitif kontrol grubunun bakteri yerleşimi açısından diğer gruplardan daha yüksek skor değerleri aldığı tespit edildi (p<0,01). İmmünohistokimyasal analizde pozitif kontrol grubunda IL1- β , RANK, RANKL boyanma skorları diğer gruplara göre anlamlı derecede daha yüksek bulunurken, OPG skorlarının melatonin grubunda diğer gruplara göre anlamlı derecede daha yüksek olduğu tespit edildi. TRAP analizinde pozitif kontrol grubunda anlamlı derecede daha fazla sayıda osteoklast olduğu tespit edildi (p<0,01).

Sonuç: Ratlarda deneysel olarak oluşturulan periapikal lezyonlarda melatonin antienflamatuar ve antirezoptif etki göstermiştir. Melatoninin periapikal lezyonlarda iyileşme üzerine etkisinin değerlendirildiği daha uzun süreli araştırmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Melatonin, periapikal lezyon, interlökin-1 β , reseptör aktivatör nükleer faktör kappa B, reseptör aktivatör nükleer faktör kappa B ligand, osteoprotegerin, tartarat-dirençli asit fosfataz

ABSTRACT

The Effect of Melatonin on Experimentally Induced Periapical Lesions

Aim: The aim of this study was to evaluate the possible effects of melatonin on experimentally induced periapical lesion in rats.

Methodology: Thirty adult Sprague-Dawley rats were divided equally into negative, positive control and melatonin groups. Experimental periapical lesion (in positive control and melatonin groups) was induced by exposure of pulp chambers of mandibular first molars to the oral environment. The melatonin group received daily intraperitoneal (IP) injections of melatonin at a dose of 10 mg/kg, whereas the control groups received only the 10% ethanol vehicle. Rats were sacrificed after 21 days. Periapical lesion dimension was evaluated by radiographic and histomorphometric analyses. Periapical inflammation was histologically evaluated and the immunohistochemical localization of IL-1 β , OPG, RANK and RANKL was examined. Presence and placement of bacteria in root canal and periapical lesion were determined by Brown-Brenn staining. The number of osteoclasts were assessed by TRAP immunohistochemistry. Data were compared using Kruskal–Wallis followed by Dunn test (for nonparametric values) and ANOVA followed by the Tukey's test (for parametric values) ($p=0,05$).

Results: There was a significant difference between the positive control and melatonin groups regarding the dimension of periapical lesion ($p<0,01$). The periapical bone loss area was significantly smaller in rats that were given daily intraperitoneal injections of melatonin. Positive control and melatonin group did not differ in terms of pixel value ($p>0,05$). The histopathological scores of melatonin group were significantly lower than those of positive control group ($p<0,01$). Histomorphometrically, the periapical bone loss area in melatonin group was significantly smaller than positive control group ($p<0,01$). A score of bacteria localization by Brown&Brenn staining in positive control group was significantly higher than the other groups ($p<0,01$). The synthesis of IL1- β , RANK, RANKL was higher in the positive control group, whereas OPG was higher in melatonin group ($p<0,01$). Number of osteoclasts were found significantly higher in positive control group by TRAP staining analyses ($p<0,01$).

Conclusions: Melatonin demonstrated anti-inflammatory and antiresorptive functions on experimentally induced periapical lesions in rats. Further studies are necessary to evaluate its possible effects on the healing of periapical lesions.

Keywords: Melatonin, periapical lesion, interleukin-1 β , receptor activator nuclear factor kappa B, receptor activator nuclear factor kappa B ligand, osteoprotegerin, tartrate-resistant acid phosphatase

KAYNAKLAR

1. Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists* 2004; 15(6): 348-381.
2. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The Effects of Surgical Exposures of Dental Pulps in Germ-Free and Conventional Laboratory Rats. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology* 1965; 20:340-349.
3. Moller AJ, Fabricius L, Dahlen G, Ohman AE, Heyden G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scandinavian journal of dental research* 1981; 89(6): 475-484.
4. Bezerra M, Carvalho J, Prokopowitsch A, Pereira R. RANK, RANKL and osteoprotegerin in arthritic bone loss. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2005; 38(2): 161-170.
5. Lacey D, Timms E, Tan H-L, Kelley M, Dunstan C, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998; 93(2): 165-176.
6. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S-i, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1998; 95(7): 3597-3602.
7. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC, DuBose RF, Cosman D, Galibert L. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 1997; 390(6656): 175-179.
8. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki S-I, Yano K, Fujise N, Sato Y, Goto M, Yamaguchi K, Kuriyama M. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro 1. *Endocrinology* 1998; 139(3): 1329-1337.
9. Simonet W, Lacey D, Dunstan C, Kelley M, Chang M-S, Lüthy R, Nguyen H, Wooden S, Bennett L, Boone T. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997; 89(2): 309-319.
10. Tan D-X, Chen L, Poeggeler B, Manchester L, Reiter R. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr j* 1993; 1(4): 57-60.
11. Tan D-X, Pöeggeler B, Reiter RJ, Chen L-D, Chen S, Lucien MC, Barlow-Walden LR. The pineal hormone melatonin inhibits DNA-adduct formation induced by the chemical carcinogen safrole in vivo. *Cancer letters* 1993; 70(1): 65-71.
12. Reiter RJ. The role of the neurohormone melatonin as a buffer against macromolecular oxidative damage. *Neurochemistry international* 1995; 27(6): 453-460.

13. Maestroni GJ. The immunotherapeutic potential of melatonin. *Expert opinion on investigational drugs* 2001; 10(3): 467-476.
14. Garcia-Maurino S, Gonzalez-Haba MG, Calvo JR, Rafii-El-Idrissi M, Sanchez-Margalet V, Goberna R, Guerrero JM. Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN-gamma production by human circulating CD4+ cells: a possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. *The Journal of Immunology* 1997; 159(2): 574-581.
15. Tamarkin L, Cohen M, Roselle D, Reichert C, Lippman M, Chabner B. Melatonin inhibition and pinealectomy enhancement of 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene-induced mammary tumors in the rat. *Cancer Research* 1981; 41(11 Part 1): 4432-4436.
16. Mao L, Dauchy RT, Blask DE, Slakey LM, Xiang S, Yuan L, Dauchy EM, Shan B, Brainard GC, Hanifin JP. Circadian gating of epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cells via melatonin-regulation of GSK3 β . *Molecular Endocrinology* 2012; 26(11): 1808-1820.
17. Hardeland R. Melatonin and the theories of aging: a critical appraisal of melatonin's role in antiaging mechanisms. *Journal of pineal research* 2013; 55(4): 325-356.
18. Nakade O, Koyama H, Arijji H, Yajima A, Kaku T. Melatonin stimulates proliferation and type I collagen synthesis in human bone cells in vitro. *Journal of pineal research* 1999; 27(2): 106-110.
19. Roth JA, Kim B-G, Lin W-L, Cho M-I. Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274(31): 22041-22047.
20. Cardinali DP, Ladizesky MG, Boggio V, Cutrera RA, Mautalen C. Melatonin effects on bone: experimental facts and clinical perspectives. *Journal of pineal research* 2003; 34(2): 81-87.
21. Koyama H, Nakade O, Takada Y, Kaku T, Lau KHW. Melatonin at Pharmacologic Doses Increases Bone Mass by Suppressing Resorption Through Down-Regulation of the RANKL-Mediated Osteoclast Formation and Activation. *Journal of Bone and Mineral Research* 2002; 17(7): 1219-1229.
22. Graves DT, Oates T, Garlet GP. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *Journal of oral microbiology* 2011; 3(17): 1-16.
23. Marton IJ, Kiss C. Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis. *Oral microbiology and immunology* 2000; 15(3): 139-150.
24. Orstavik D, Pitt-Ford T. Prevention and treatment of apical periodontitis. *Essential Endodontology*, New York: Wiley-Blackwell, 2008: p.87-103.
25. Friedman S. Considerations and concepts of case selection in the management of post-treatment endodontic disease (treatment failure). *Endodontic Topics* 2002; 1(1): 54-78.

26. Cohen S, Hargreaves KM. Cohen's pathways of the pulp. 10 Ed., St. Louis, Missouri: Mosby Elsevier, 2011, p.156-178.
27. Sundqvist G. Bacteriological studies of necrotic dental pulps. University of Umea, Umea, 1976, 1-128.
28. Miller WD. The micro-organisms of the human mouth: the local and general diseases which are caused by them, Philadelphia: The S.S. White Dental MFG Co, 1890, p.56-87.
29. Lin LM, Di Fiore PM, Lin J, Rosenberg PA. Histological study of periradicular tissue responses to uninfected and infected devitalized pulps in dogs. *Journal of endodontics* 2006; 32(1): 34-38.
30. Hou L, Wang X. PKC and PKA, but not PKG mediate LPS-induced CGRP release and [Ca²⁺] i elevation in DRG neurons of neonatal rats. *Journal of neuroscience research* 2001; 66(4): 592-600.
31. Diehl SR, Wang Y, Brooks CN, Burmeister JA, Califano JV, Wang S, Schenkein HA. Linkage disequilibrium of interleukin-1 genetic polymorphisms with early-onset periodontitis. *Journal of periodontology* 1999; 70(4): 418-430.
32. Majno G, Joris I. Cells, tissues, and disease: principles of general pathology. 2 Ed., Oxford: Oxford University Press, 2004, p.214-246.
33. Williams BL, McCann GF, Schoenknecht F. Bacteriology of dental abscesses of endodontic origin. *Journal of Clinical Microbiology* 1983; 18(4): 770-774.
34. Van Winkelhoff A, Carlee A, De Graaff J. *Bacteroides endodontalis* and other black-pigmented *Bacteroides* species in odontogenic abscesses. *Infection and Immunity* 1985; 49(3): 494-497.
35. Oguntebi B, Slee A, Tanzer J, Langeland K. Predominant microflora associated with human dental periapical abscesses. *Journal of clinical microbiology* 1982; 15(5): 964-966.
36. Haapasalo M, Ranta K, Ranta H. Mixed anaerobic periapical infection with sinus tract. *Dental Traumatology* 1987; 3(2): 83-85.
37. Weiger R, Manncke B, Werner H, Löst C. Microbial flora of sinus tracts and root canals of non-vital teeth. *Dental Traumatology* 1995; 11(1): 15-19.
38. Stern M, Dreizen S, Mackler B, Levy B. Isolation and characterization of inflammatory cells from the human periapical granuloma. *Journal of dental research* 1982; 61(12): 1408-1412.
39. Tronstad L, Barnett F, Riso K, Slots J. Extraradicular endodontic infections. *Dental Traumatology* 1987; 3(2): 86-90.
40. Langeland K, Block RM, Va R, Grossman LI. A histopathologic and histobacteriologic study of 35 periapical endodontic surgical specimens. *Journal of endodontics* 1977; 3(1): 8-23.
41. Nair P. Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response. *Periodontology* 2000 1997; 13(1): 121-148.

42. Walton RE, Ardjmand K. Histological evaluation of the presence of bacteria in induced periapical lesions in monkeys. *Journal of endodontics* 1992; 18(5): 216-221.
43. Sundqvist G, Figdor D. Life as an endodontic pathogen. *Endodontic Topics* 2003; 6(1): 3-28.
44. Sundqvist G. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* 1994; 78(4): 522-530.
45. Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *International endodontic journal* 1998; 31(1): 1-7.
46. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 1998; 85(1): 86-93.
47. Siqueira JF, Rôças IN. Polymerase chain reaction–based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 2004; 97(1): 85-94.
48. Peciuliene V, Reynaud A, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *International endodontic journal* 2001; 34(6): 429-434.
49. Kayaoglu G, Ørstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 2004; 15(5): 308-320.
50. Hancock H, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 2001; 91(5): 579-586.
51. Seltzer S, Bender I, Ziontz M. The dynamics of pulp inflammation: correlations between diagnostic data and actual histologic findings in the pulp. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* 1963; 16(8): 969-977.
52. Andreasen JO, Andreasen FM, Andersson L. Textbook and color atlas of traumatic injuries to the teeth. 4 Ed., Oxford: Blackwell Publishing Ltd., 2007, p. 68-83.
53. Hauman C, Love R. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. *International endodontic journal* 2003; 36(2): 75-85.
54. Nair PR, Sjögren U, Krey G, Sundqvist G. Therapy-resistant foreign body giant cell granuloma at the periapex of a root-filled human tooth. *Journal of endodontics* 1990; 16(12): 589-595.

55. Goering R, Dockrell H, Zuckerman M, Wakelin D, Roitt I, Mims C, Chiodini P. *Mim's Medical Microbiology*. 4 Ed., Philadelphia: Mosby Elsevier, 2008, p.77-120.
56. Underhill DM, Ozinsky A. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Current opinion in immunology* 2002; 14(1): 103-110.
57. Janeway Jr CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annual review of immunology* 2002; 20(1): 197-216.
58. Hou L, Sasaki H, Stashenko P. Toll-like receptor 4-deficient mice have reduced bone destruction following mixed anaerobic infection. *Infection and immunity* 2000; 68(8): 4681-4687.
59. Wadachi R, Hargreaves K. Trigeminal nociceptors express TLR-4 and CD14: a mechanism for pain due to infection. *Journal of dental research* 2006; 85(1): 49-53.
60. Takeuchi O, Hoshino K, Akira S. Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *The Journal of Immunology* 2000; 165(10): 5392-5396.
61. Echchannaoui H, Frei K, Schnell C, Leib SL, Zimmerli W, Landmann R. Toll-like receptor 2-deficient mice are highly susceptible to *Streptococcus pneumoniae* meningitis because of reduced bacterial clearing and enhanced inflammation. *Journal of Infectious Diseases* 2002; 186(6): 798-806.
62. Babior B. The respiratory burst of phagocytes. *Journal of Clinical Investigation* 1984; 73(3): 599-607.
63. Nauseef WM. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunological reviews* 2007; 219(1): 88-102.
64. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychlinsky A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *The Journal of cell biology* 2007; 176(2): 231-241.
65. Brinkmann V, Zychlinsky A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nature Reviews Microbiology* 2007; 5(8): 577-582.
66. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and molecular immunology*. 8 Ed., Philadelphia: Elsevier, 2015; p.107-287.
67. Serbina NV, Jia T, Hohl TM, Pamer EG. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annual review of immunology* 2008; 26: 421-431.
68. Van Oosterhout A, Bloksma N. Regulatory T-lymphocytes in asthma. *European Respiratory Journal* 2005; 26(5): 918-932.
69. Damoiseaux J. Regulatory T cells: back to the future. *Neth J Med* 2006; 64(1): 4-9.
70. Wallstrom JB, Torabinejad M, Kettering J, McMillan P. Role of T cells in the pathogenesis of periapical lesions: a preliminary report. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology* 1993; 76(2): 213-218.

71. Tani-Ishii N, Kuchiba K, Osada T, Watanabe Y, Umemoto T. Effect of T-cell deficiency on the formation of periapical lesions in mice: histological comparison between periapical lesion formation in BALB/c and BALB/c nu/nu mice. *Journal of endodontics* 1995; 21(4): 195-199.
72. Teles R, Wang CY, Stashenko P. Increased susceptibility of RAG-2 SCID mice to dissemination of endodontic infections. *Infection and immunity* 1997; 65(9): 3781-3787.
73. Hou L, Sasakj H, Stashenko P. B-cell deficiency predisposes mice to disseminating anaerobic infections: protection by passive antibody transfer. *Infection and immunity* 2000; 68(10): 5645-5651.
74. Hargreaves K, Goodis H, Seltzer SS. *Bender's dental pulp*. 1 ed. Chicago: Quintessence Pub. Co., 2002, p.36-54.
75. Caviedes-Bucheli J, Muñoz HR, Azuero-Holguín MM, Ulate E. Neuropeptides in dental pulp: the silent protagonists. *Journal of endodontics* 2008; 34(7): 773-788.
76. Birklein F, Schmelz M. Neuropeptides, neurogenic inflammation and complex regional pain syndrome (CRPS). *Neuroscience letters* 2008; 437(3): 199-202.
77. Stashenko P, Teles R, D'Souza R. Periapical inflammatory responses and their modulation. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists* 1998; 9(4): 498-521.
78. Gonzalez-Rey E, Chorny A, Delgado M. Regulation of immune tolerance by anti-inflammatory neuropeptides. *Nature Reviews Immunology* 2007; 7(1): 52-63.
79. Hargreaves KM, Swift JQ, Roszkowski MT, Bowles W, Garry MG, Jackson DL. Pharmacology of peripheral neuropeptide and inflammatory mediator release. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology* 1994; 78(4): 503-510.
80. Hirvonen T, Hippo P, Narhi M. The effect of an opioid antagonist and a somatostatin antagonist on the nerve function in normal and inflamed dog dental pulps. *Journal of dental research* 1998; 1329-1329.
81. Sigurdsson A. Pulpal diagnosis. *Endodontic Topics* 2003; 5(1): 12-25.
82. Lin LM, Pascon EA, Skribner J, Gängler P, Langeland K. Clinical, radiographic, and histologic study of endodontic treatment failures. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology* 1991; 71(5): 603-611.
83. Block RM, Bushell A, Rodrigues H, Langeland K. A histopathologic, histobacteriologic, and radiographic study of periapical endodontic surgical specimens. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* 1976; 42(5): 656-678.
84. Green T, Walton R, Taylor J, Merrell P. Radiographic and histologic periapical findings of root canal treated teeth in cadaver. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 1997; 83(6): 707-711.
85. Brynolf I. A histological and roentgenological study of the periapical region of human upper incisors. *Odonto Revy Supp* 1967; 18(11): 28-32.

86. Barthel CR, Zimmer S, Trope M. Relationship of radiologic and histologic signs of inflammation in human root-filled teeth. *Journal of endodontics* 2004; 30(2): 75-79.
87. Huumonen S, Ørstavik D. Radiological aspects of apical periodontitis. *Endodontic Topics* 2002; 1(1): 3-25.
88. Bender I, Seltzer S. Roentgenographic and direct observation of experimental lesions in bone: I. *The Journal of the American Dental Association* 1961; 62(2): 152-160.
89. Bender I. Factors influencing the radiographic appearance of bony lesions. *Journal of endodontics* 1982; 8(4): 161-170.
90. Syrjänen S, Tammissalo E, Lilja R, Syrjänen K. Radiological interpretation of the periapical cysts and granulomas. *Dentomaxillofacial Radiology* 1982; 11(2): 89-92.
91. Lalonde ER. A new rationale for the management of periapical granulomas and cysts: an evaluation of histopathological and radiographic findings. *The Journal of the American Dental Association* 1970; 80(5): 1056-1059.
92. Organization WH. Application of the international classification of diseases to dentistry and stomatology. 3 Ed., Geneva: World Health Organization, 1995, p.144-148.
93. Torabinejad M, Walton RE, Fouad A. *Endodontics: principles and practice*. 4 Ed., St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier, 2008, p.49-67.
94. Ingle JJ. *Ingle's endodontics* 6. 6 Ed., Hamilton: BC Decker Inc., 2008, p.494-519.
95. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*. 8 Ed., Philadelphia: Elsevier, 2010, p.43-78.
96. Slauson DO, Cooper BJ. *Mechanisms of disease: a textbook of comparative general pathology*. 3 Ed., St. Louis, Missouri: Mosby, 2002, p.198-230.
97. Kovačević M, Tamarut T, Jonjić N, Braut A, Kovačević M. The transition from pulpitis to periapical periodontitis in dogs' teeth. *Australian Endodontic Journal* 2008; 34(1): 12-18.
98. Kimberly C, Byers M. Inflammation of rat molar pulp and periodontium causes increased calcitonin gene-related peptide and axonal sprouting. *The anatomical record* 1988; 222(3): 289-300.
99. Yamasaki M, Kumazawa M, Kohsaka T, Nakamura H, Kameyama Y. Pulpal and periapical tissue reactions after experimental pulpal exposure in rats. *Journal of endodontics* 1994; 20(1): 13-17.
100. Stashenko P, Wang C, Riley E, Wu Y, Ostroff G, Niederman R. Reduction of infection-stimulated periapical bone resorption by the biological response modifier PGG glucan. *Journal of dental research* 1995; 74(1): 323-330.
101. Lin L, Langeland K. Light and electron microscopic study of teeth with carious pulp exposures. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* 1981; 51(3): 292-316.

102. Burd PR, Rogers HW, Gordon JR, Martin CA, Jayaraman S, Wilson SD, Dvorak AM, Galli S, Dorf ME. Interleukin 3-dependent and-independent mast cells stimulated with IgE and antigen express multiple cytokines. *The Journal of experimental medicine* 1989; 170(1): 245-257.
103. Kierszenbaum A. *Histology and Cell Biology*. ed., Philadelphia: Mosby, 2011, p.169-202.
104. Ley K. Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process. *Cardiovascular Research* 1996; 32(4): 733-742.
105. Kawashima N, Okiji T, Kosaka T, Suda H. Kinetics of macrophages and lymphoid cells during the development of experimentally induced periapical lesions in rat molars: a quantitative immunohistochemical study. *Journal of endodontics* 1996; 22(6): 311-316.
106. Akamine A, Hashinguchi I, Toriya Y, Maeda K. Immunohistochemical examination on the localization of macrophages and plasma cells in induced rat periapical lesions. *Dental Traumatology* 1994; 10(3): 121-128.
107. Okiji T, Kawashima N, Kosaka T, Kobayashi C, Suda H. Distribution of la antigen-expressing nonlymphoid cells in various stages of induced periapical lesions in rat molars. *Journal of endodontics* 1994; 20(1): 27-31.
108. Haanen C, Vermes I. Apoptosis and inflammation. *Mediators of inflammation* 1995; 4(1): 5-15.
109. Slots J, Nowzari H, Sabeti M. Cytomegalovirus infection in symptomatic periapical pathosis. *International endodontic journal* 2004; 37(8): 519-524.
110. Sabeti M, Simon J, Nowzari H, Slots J. Cytomegalovirus and Epstein-Barr virus active infection in periapical lesions of teeth with intact crowns. *Journal of endodontics* 2003; 29(5): 321-323.
111. Hahn C-L, Liewehr FR. Innate immune responses of the dental pulp to caries. *Journal of endodontics* 2007; 33(6): 643-651.
112. Stashenko P. The role of immune cytokines in the pathogenesis of periapical lesions. *Dental Traumatology* 1990; 6(3): 89-96.
113. Silva T, Garlet G, Fukada S, Silva J, Cunha F. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. *Journal of dental research* 2007; 86(4): 306-319.
114. Brain SD. Sensory neuropeptides: their role in inflammation and wound healing. *Immunopharmacology* 1997; 37(2): 133-152.
115. Richardson JD, Vasko MR. Cellular mechanisms of neurogenic inflammation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2002; 302(3): 839-845.
116. Schäffer M, Beiter T, Becker HD, Hunt TK. Neuropeptides: mediators of inflammation and tissue repair? *Archives of Surgery* 1998; 133(10): 1107-1116.

117. Tani-Ishii N, Wang CY, Stashenko P. Immunolocalization of bone-resorptive cytokines in rat pulp and periapical lesions following surgical pulp exposure. *Oral microbiology and immunology* 1995; 10(4): 213-219.
118. Wang CY, Stashenko P. The role of interleukin-1 α in the pathogenesis of periapical bone destruction in a rat model system. *Oral microbiology and immunology* 1993; 8(1): 50-56.
119. Ataoglu T, Ungor M, Serpek B, Haliloglu S, Ataoglu H, Ari H. Interleukin-1beta and tumour necrosis factor-alpha levels in periapical exudates. *International endodontic journal* 2002; 35(2): 181-185.
120. Barkhordar RA, Hussain MZ, Hayashi C. Detection of interleukin-1 beta in human periapical lesions. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology* 1992; 73(3): 334-336.
121. Lim GC, Torabinejad M, Kettering J, Linkhardt TA, Finkelman RD. Interleukin 1 β in symptomatic and asymptomatic human periradicular lesions. *Journal of endodontics* 1994; 20(5): 225-227.
122. Matsuo T, Ebisu S, Nakanishi T, Yonemura K, Harada Y, Okada H. Interleukin-1 α and interleukin-1 β in periapical exudates of infected root canals: correlations with the clinical findings of the involved teeth. *Journal of endodontics* 1994; 20(9): 432-435.
123. Tatakis D. Interleukin-1 and bone metabolism: a review. *Journal of periodontology* 1993; 64(5 Suppl): 416-431.
124. Stashenko P, Dewhirst F, Peros W, Kent R, Ago J. Synergistic interactions between interleukin-1, tumor necrosis factor, and lymphotoxin in bone resorption. *Journal of Immunology* 1987; 138: 1464-1468.
125. Seymour GJ, Gemmell E. Cytokines in periodontal disease: where to from here? *Acta Odontologica* 2001; 59(3): 167-173.
126. Kawashima N, Suzuki N, Yang G, Ohi C, Okuhara S, Nakano-Kawanishi H, Suda H. Kinetics of RANKL, RANK and OPG expressions in experimentally induced rat periapical lesions. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 2007; 103(5): 707-711.
127. Khan A, Hargreaves KM. Dental Pain In: The Puzzle of Orofacial Pain. Türp JC, Sommer C, Alfons WH, eds. Basel: S Karger AG, 2007; 75-90.
128. Byers MR, Taylor PE, Khayat BG, Kimberly CL. Effects of injury and inflammation on pulpal and periapical nerves. *Journal of endodontics* 1990; 16(2): 78-84.
129. Warren JR. *Essentials of general pathology*, London: McGraw Hill, 1987: p.1-259.
130. Trowbridge HO, Emling RC, Fornatora M. Inflammation. A Review of the Process. *Implant Dentistry* 1997; 6(3): 238.
131. Hirsh BC, Johnson WC. Concepts of granulomatous inflammation. *International journal of dermatology* 1984; 23(2): 90-100.

132. Noiri Y, Ehara A, Kawahara T, Takemura N, Ebisu S. Participation of bacterial biofilms in refractory and chronic periapical periodontitis. *Journal of endodontics* 2002; 28(10): 679-683.
133. Kaneko T, Okiji T, Kan L, Takagi M, Suda H. Ultrastructural analysis of MHC class II molecule-expressing cells in experimentally induced periapical lesions in the rat. *Journal of endodontics* 2001; 27(5): 337-342.
134. Wang C-Y, Stashenko P. Kinetics of bone-resorbing activity in developing periapical lesions. *Journal of dental research* 1991; 70(10): 1362-1366.
135. Wang C-Y, Tani-Ishii N, Stashenko P. Bone-resorptive cytokine gene expression in periapical lesions in the rat. *Oral microbiology and immunology* 1997; 12(2): 65-71.
136. Dziak R. Biochemical and molecular mediators of bone metabolism. *Journal of periodontology* 1993; 64(5): 407-415.
137. Teitelbaum SL, Tondravi MM, Ross FP. Osteoclasts, macrophages, and the molecular mechanisms of bone resorption. *Journal of leukocyte biology* 1997; 61(4): 381-388.
138. Reddy SV, Roodman GD. Control of osteoclast differentiation. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* 1998; 8(1): 1-17.
139. Mundy GR. Inflammatory mediators and the destruction of bone. *Journal of periodontal research* 1991; 26(3): 213-217.
140. Lerner U. Inflammation-induced bone remodeling in periodontal disease and the influence of post-menopausal osteoporosis. *Journal of dental research* 2006; 85(7): 596-607.
141. Khosla S. Minireview: The *opg/rankl/rank* system. *Endocrinology* 2001; 142(12): 5050-5055.
142. Yasuda H. Bone and bone related biochemical examinations. Bone and collagen related metabolites. Receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL). *Clinical calcium* 2006; 16(6): 964-970.
143. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003; 423(6937): 337-342.
144. Baron R. Molecular mechanisms of bone resorption by the osteoclast. *The Anatomical Record* 1989; 224(2): 317-324.
145. Bartkiewicz M, Hernando N, Reddy SV, Roodman GD, Baron R. Characterization of the osteoclast vacuolar H⁺-ATPase B-subunit. *Gene* 1995; 160(2): 157-164.
146. Sahara N, Toyoki A, Ashizawa Y, Deguchi T, Suzuki K. Cytodifferentiation of the odontoclast prior to the shedding of human deciduous teeth: an ultrastructural and cytochemical study. *The Anatomical Record* 1996; 244(1): 33-49.
147. Sasaki T. Differentiation and functions of osteoclasts and odontoclasts in mineralized tissue resorption. *Microscopy research and technique* 2003; 61(6): 483-495.

148. Nair PR, Pajarola G, Schroeder HE. Types and incidence of human periapical lesions obtained with extracted teeth. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 1996; 81(1): 93-102.
149. Browne R. The origin of cholesterol in odontogenic cysts in man. *Archives of oral biology* 1971; 16(1): 107-113.
150. Shear M. The histogenesis of dental cysts. *Dent Pract* 1963; 13: 238-243.
151. Simon JH, Yonemoto GS, Bakland LK. Comparison of cellular cementum in normal and diseased teeth-a scanning electron microscopic study. *Journal of endodontics* 1981; 7(8): 370-375.
152. Vier FV, Figueiredo JAPD. Prevalence of different periapical lesions associated with human teeth and their correlation with the presence and extension of apical external root resorption. *International endodontic journal* 2002; 35(8): 710-719.
153. Wayman BE, Murata SM, Almeida RJ, Fowler CB. A bacteriological and histological evaluation of 58 periapical lesions. *Journal of endodontics* 1992; 18(4): 152-155.
154. Abou-Rass M, Bogen G. Microorganisms in closed periapical lesions. *International endodontic journal* 1998; 31(1): 39-47.
155. Ten Cate A. The epithelial cell rests of Malassez and the genesis of the dental cyst. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* 1972; 34(6): 956-964.
156. Nair P, Sundqvist G, Sjögren U. Experimental evidence supports the abscess theory of development of radicular cysts. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 2008; 106(2): 294-303.
157. Lin LM, Huang GT-J, Rosenberg PA. Proliferation of epithelial cell rests, formation of apical cysts, and regression of apical cysts after periapical wound healing. *Journal of endodontics* 2007; 33(8): 908-916.
158. Simon JH. Incidence of periapical cysts in relation to the root canal. *Journal of endodontics* 1980; 6(11): 845-848.
159. Kramer IR, Pindborg JJ, Shear M. *Histological typing of odontogenic tumours: Springer Science & Business Media*, 1992: p.1-122.
160. Shear M, Seward GR. *Cysts of the oral regions*, London: John Wright, 1992, p.143-149.
161. Lin L, WANG SL, WU-WANG C, CHANG KM, Leung C. Detection of epidermal growth factor receptor in inflammatory periapical lesions. *International endodontic journal* 1996; 29(3): 179-184.
162. Gao Z, Flaitz C, Mackenzie I. Expression of keratinocyte growth factor in periapical lesions. *Journal of dental research* 1996; 75(9): 1658-1663.
163. Thesleff I. Epithelial cell rests of Malassez bind epidermal growth factor intensely. *Journal of periodontal research* 1987; 22(5): 419-421.

164. Harris M, Jenkins M, Bennett A, Wills M. Prostaglandin production and bone resorption by the benign intraosseous dental cyst. *Clinical science* 1973; 44(6): 24-35.
165. Harris M, Goldhaber P. The production of a bone resorbing factor by dental cysts in vitro. *British Journal of Oral Surgery* 1973; 10: 334-338.
166. Birek C, Heersche J, Jez D, Brunette D. Secretion of a bone resorbing factor by epithelial cells cultured from porcine rests of Malassez. *Journal of periodontal research* 1983; 18(1): 75-81.
167. Teronen O, Salo T, Laitinen J, Töwall J, Ylipaavalniemi P, Konttinen YT, Hietanen J, Sorsa T. Characterization of interstitial collagenases in jaw cyst wall. *European journal of oral sciences* 1995; 103(3): 141-147.
168. Toller P. The osmolality of fluids from cysts of the jaws. *British dental journal* 1970; 129(6): 275-292.
169. Toller P. Experimental investigation into factors concerning the growth of cysts of the jaws. *Proceedings of the Royal Society of Medicine* 1948; 41(10): 681-697.
170. James WW. Do epithelial odontomes increase in size by their own tension? *Proceedings of the Royal Society of Medicine* 1926; 19: 73-76.
171. Formigli L, Orlandini SZ, Tonelli P, Giannelli M, Martini M, Brandi ML, Bergamini M, Orlandini GE. Osteolytic processes in human radicular cysts: morphological and biochemical results. *Journal of oral pathology & medicine* 1995; 24(5): 216-220.
172. Torabinejad M, Kettering JD. Identification and relative concentration of B and T lymphocytes in human chronic periapical lesions. *Journal of endodontics* 1985; 11(3): 122-125.
173. Ricucci D, Pascon EA, Ford TRP, Langeland K. Epithelium and bacteria in periapical lesions. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 2006; 101(2): 239-249.
174. Barrett P, Bolborea M. Molecular pathways involved in seasonal body weight and reproductive responses governed by melatonin. *Journal of pineal research* 2012; 52(4): 376-388.
175. Costa IC, Carvalho HN, Fernandes L. Aging, circadian rhythms and depressive disorders: a review. *American journal of neurodegenerative disease* 2013; 2(4): 228.
176. McCord CP, Allen FP. Evidences associating pineal gland function with alterations in pigmentation. *Journal of Experimental Zoology* 1917; 23(1): 207-224.
177. Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocyteS1. *Journal of the American Chemical Society* 1958; 80(10): 2587-2587.
178. Reiter RJ, Tan DX, Galano A. Melatonin: exceeding expectations. *Physiology* 2014; 29(5): 325-333.

179. Reiter RJ, Tan D-X, Rosales-Corral S, C Manchester L. The universal nature, unequal distribution and antioxidant functions of melatonin and its derivatives. *Mini reviews in medicinal chemistry* 2013; 13(3): 373-384.
180. Roopin M, Levy O. Temporal and histological evaluation of melatonin patterns in a 'basal' metazoan. *Journal of pineal research* 2012; 53(3): 259-269.
181. Rodriguez-Naranjo MI, Torija MJ, Mas A, Cantos-Villar E, Garcia-Parrilla MdC. Production of melatonin by *Saccharomyces* strains under growth and fermentation conditions. *Journal of pineal research* 2012; 53(3): 219-224.
182. Mercolini L, Mandrioli R, Raggi MA. Content of melatonin and other antioxidants in grape-related foodstuffs: measurement using a MEPS-HPLC-F method. *Journal of pineal research* 2012; 53(1): 21-28.
183. Reiter RJ, Tan DX, Korkmaz A, Rosales-Corral SA. Melatonin and stable circadian rhythms optimize maternal, placental and fetal physiology. *Human reproduction update* 2014; 20(2): 293-307.
184. Reiter RJ. The mammalian pineal gland: structure and function. *American Journal of Anatomy* 1981; 162(4): 287-313.
185. Kappers JA. The mammalian pineal gland, a survey. *Acta neurochirurgica* 1976; 34(1): 109-149.
186. Fung BK-K. Transducin: structure, function and role in phototransduction. *Progress in retinal research* 1987; 6: 151-177.
187. Zhao X, Stafford BK, Godin AL, King WM, Wong KY. Photoresponse diversity among the five types of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *The Journal of physiology* 2014; 592(7): 1619-1636.
188. Lucas RJ, Peirson SN, Berson DM, Brown TM, Cooper HM, Czeisler CA, Figueiro MG, Gamlin PD, Lockley SW, O'Hagan JB. Measuring and using light in the melanopsin age. *Trends in neurosciences* 2014; 37(1): 1-9.
189. Owens L, Buhr E, Tu DC, Lamprecht TL, Lee J, Van Gelder RN. Effect of circadian clock gene mutations on nonvisual photoreception in the mouse. *Investigative ophthalmology & visual science* 2012; 53(1): 454.
190. Reiter RJ, Hester R. Interrelationships of the Pineal Gland, the Superior Cervical Ganglia and the Photoperiod in the Regulation of the Endocrine Systems of Hamsters 1. *Endocrinology* 1966; 79(6): 1168-1170.
191. Cano P, Jiménez-Ortega V, Larrad Á, Toso CFR, Cardinali DP, Esquifino AI. Effect of a high-fat diet on 24-h pattern of circulating levels of prolactin, luteinizing hormone, testosterone, corticosterone, thyroid-stimulating hormone and glucose, and pineal melatonin content, in rats. *Endocrine* 2008; 33(2): 118-125.
192. Coon SL, Roseboom PH, Baler R, Weller JL, Namboodiri M, Koonin EV, Klein DC. Pineal serotonin N-acetyltransferase: expression cloning and molecular analysis. *Science* 1995; 270(5242): 1681-1683.
193. Axelrod J, Weissbach H. Enzymatic O-methylation of N-acetylserotonin to melatonin. *Science* 1960; 131(3409): 1312-1312.

194. Stehle JH, Saade A, Rawashdeh O, Ackermann K, Jilg A, Sebestény T, Maronde E. A survey of molecular details in the human pineal gland in the light of phylogeny, structure, function and chronobiological diseases. *Journal of pineal research* 2011; 51(1): 17-43.
195. Reiter RJ. Melatonin: the chemical expression of darkness. *Molecular and cellular endocrinology* 1991; 79(1): 153-158.
196. Waldhauser F, Dietzel M. Daily and annual rhythms in human melatonin secretion: role in puberty control. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1985; 453(1): 205-214.
197. Lynch H, Wurtman R, Moskowitz M, Archer M, Ho M. Daily rhythm in human urinary melatonin. *Science* 1975; 187: 169-171.
198. Brzezinski A. Melatonin in humans. *N Engl J Med* 1997; 336(3): 186-195.
199. Venegas C, García JA, Escames G, Ortiz F, López A, Doerrier C, García-Corzo L, López LC, Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D. Extrapineal melatonin: analysis of its subcellular distribution and daily fluctuations. *Journal of pineal research* 2012; 52(2): 217-227.
200. Reiter RJ, Tan D-X, Rosales-Corral S, C Manchester L. The universal nature, unequal distribution and antioxidant functions of melatonin and its derivatives. *Mini reviews in medicinal chemistry* 2013; 13(3): 373-384.
201. Czeisler CA, Shanahan TL, Klerman EB, Martens H, Brotman DJ, Emens JS, Klein T, Rizzo JF. Suppression of melatonin secretion in some blind patients by exposure to bright light. *New England Journal of Medicine* 1995; 332(1): 6-11.
202. Waldhauser F, Waldhauser M, Lieberman H, Deng M-H, Lynch H, Wurtman R. Bioavailability of oral melatonin in humans. *Neuroendocrinology* 1984; 39(4): 307-313.
203. Dollins AB, Zhdanova IV, Wurtman RJ, Lynch HJ, Deng MH. Effect of inducing nocturnal serum melatonin concentrations in daytime on sleep, mood, body temperature, and performance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1994; 91(5): 1824-1828.
204. Wright J, Aldhous M, Franey C, English J, Arendt J. The effects of exogenous melatonin on endocrine function in man. *Clinical endocrinology* 1986; 24(4): 375-382.
205. Nordlund JJ, Lerner AB. The effects of oral melatonin on skin color and on the release of pituitary hormones. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1977; 45(4): 768-774.
206. Stankov B, Reiter RJ. Melatonin receptors: current status, facts, and hypotheses. *Life sciences* 1990; 46(14): 971-982.
207. Reppert SM. Melatonin receptors: molecular biology of a new family of G protein-coupled receptors. *Journal of Biological Rhythms* 1997; 12(6): 528-531.

208. Dubocovich ML, Cardinali DP, Guardiola-Lemaitre B, Hagan RM, Krause DN, Sugden D, Vanhoutte PM, Yocca FD. Melatonin receptors. The IUPHAR Compendium of Receptor Characterization and Classification, London: IUPHAR Media, 1998; p.187-193.
209. Hardeland R. Melatonin: signaling mechanisms of a pleiotropic agent. *Biofactors* 2009; 35(2): 183-192.
210. Benitez-King G, Anton-Tay F. Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. *Experientia* 1993; 49(8): 635-641.
211. Stankov B, Fraschini F, Reiter RJ. Melatonin binding sites in the central nervous system. *Brain research reviews* 1991; 16(3): 245-256.
212. Lee P, Pang S. Melatonin and its receptors in the gastrointestinal tract. *Neurosignals* 1993; 2(4): 181-193.
213. Yie S-M, Niles L, Younglai E. Melatonin receptors on human granulosa cell membranes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1995; 80(5): 1747-1749.
214. Viswanathan M, Laitinen JT, Saavedra JM. Expression of melatonin receptors in arteries involved in thermoregulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1990; 87(16): 6200-6203.
215. Reiter RJ, Paredes SD, Manchester LC, Tan D-X. Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 2009; 44(4): 175-200.
216. Galano A. On the direct scavenging activity of melatonin towards hydroxyl and a series of peroxy radicals. *Physical Chemistry Chemical Physics* 2011; 13(15): 7178-7188.
217. Lei Q, Wang L, Tan DX, Zhao Y, Zheng XD, Chen H, Li Qt, Zuo Bx, Kong J. Identification of genes for melatonin synthetic enzymes in 'Red Fuji' apple (*Malus domestica* Borkh. cv. Red) and their expression and melatonin production during fruit development. *Journal of pineal research* 2013; 55(4): 443-451.
218. Görgün FM, Öztürk Z, Gümüştaş MK, Kökoğlu E. Melatonin administration affects plasma total sialic acid and lipid peroxidation levels in streptozotocin induced diabetic rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A* 2002; 65(10): 695-700.
219. Lissoni P, Rovelli F, Brivio F, Brivio O, Fumagalli L. Circadian secretions of IL-2, IL-12, IL-6 and IL-10 in relation to the light/dark rhythm of the pineal hormone melatonin in healthy humans. *Natural immunity* 1998; 16(1): 1-5.
220. Cutando A, Arana C, Gomez-Moreno G. Melatonin plasma and salivary and lymphocyte subpopulation in periodontal patients. *Special Care Dentistry* 2004; 24: 169-176.
221. García-Mauriño S, Pozo D, Calvo JR, Guerrero JM. Correlation between nuclear melatonin receptor expression and enhanced cytokine production in human lymphocytic and monocytic cell lines. *Journal of pineal research* 2000; 29(3): 129-137.

222. Lardone PJ, Carrillo-Vico A, Naranjo MC, De Felipe B, Vallejo A, Karasek M, Guerrero JM. Melatonin synthesized by Jurkat human leukemic T cell line is implicated in IL-2 production. *Journal of cellular physiology* 2006; 206(1): 273-279.
223. Martín V, Herrera F, Carrera-Gonzalez P, García-Santos G, Antolín I, Rodríguez-Blanco J, Rodríguez C. Intracellular signaling pathways involved in the cell growth inhibition of glioma cells by melatonin. *Cancer research* 2006; 66(2): 1081-1088.
224. Lerner A, Case J. Melatonin. *Federation Proceedings* 1960; 590-592.
225. Haimov I, Laudon M, Zisapel N, Souroujon M, Nof D, Shlitner A, Herer P, Tzischinsky O, Lavie P. Sleep disorders and melatonin rhythms in elderly people. *Bmj* 1994; 309(6948): 167-178.
226. Tzischinsky O, Lavie P. Melatonin possesses time-dependent hypnotic effects. *Sleep: Journal of Sleep Research & Sleep Medicine* 1994; 17(7): 638-645.
227. Garfinkel D, Laudon M, Nof D, Zisapel N. Improvement of sleep quality in elderly people by controlled-release melatonin. *The Lancet* 1995; 346(8974): 541-544.
228. Lewy AJ, Newsome DA. Different types of melatonin circadian secretory rhythms in some blind subjects. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1983; 56(6): 1103-1107.
229. Lewy AJ, Sack RL, Blood ML, Bauer VK, Cutler NL, Thomas KH. Melatonin marks circadian phase position and resets the endogenous circadian pacemaker in humans. *Circadian Clocks and their Adjustment* 1995; 303-326.
230. Reiter RJ. The Pineal and Its Hormones in the Control of Reproduction in Mammals. *Endocrine Reviews* 1980; 1(2): 109-131.
231. Reiter RJ. The pineal gland and melatonin in relation to aging: a summary of the theories and of the data. *Experimental gerontology* 1995; 30(3): 199-212.
232. Van Coevorden A, Mockel J, Laurent E, Kerkhofs M, L'Hermite-Baleriaux M, Decoster C, Neve P, Van Cauter E. Neuroendocrine rhythms and sleep in aging men. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism* 1991; 260(4): 651-661.
233. Dilman V, Anisimov V, Ostroumova M, Khavinson VK, Morozov V. Increase in lifespan of rats following polypeptide pineal extract treatment. *Experimentelle Pathologie* 1979; 17(9): 539-545.
234. Pierpaoli W, Regelson W. Pineal control of aging: effect of melatonin and pineal grafting on aging mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1994; 91(2): 787-791.
235. Reiter RJ, Guerrero JM, Garcia JJ, Acuna-castroviejo D. Reactive oxygen intermediates, molecular damage, and aging: relation to melatonin. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1998; 854(1): 410-424.
236. Rosales-Corral SA, Acuña-Castroviejo D, Coto-Montes A, Boga JA, Manchester LC, Fuentes-Broto L, Korkmaz A, Ma S, Tan DX, Reiter RJ.

- Alzheimer's disease: pathological mechanisms and the beneficial role of melatonin. *Journal of pineal research* 2012; 52(2): 167-202.
237. Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Avanzas P. The role of melatonin in acute myocardial infarction. *Front Biosci* 2012; 17: 2433-2441.
 238. Kim T-K, Kleszczyński K, Janjetovic Z, Sweatman T, Lin Z, Li W, Reiter RJ, Fischer TW, Slominski AT. Metabolism of melatonin and biological activity of intermediates of melatonergic pathway in human skin cells. *The FASEB Journal* 2013; 27(7): 2742-2755.
 239. Nduhirabandi F, du Toit EF, Lochner A. Melatonin and the metabolic syndrome: a tool for effective therapy in obesity-associated abnormalities? *Acta physiologica* 2012; 205(2): 209-223.
 240. Reiter RJ, Tan DX, Pappolla MA. Melatonin relieves the neural oxidative burden that contributes to dementias. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2004; 1035(1): 179-196.
 241. Miller SC, Pandi PS, Esquifino AI, Cardinali DP, Maestroni GJ. The role of melatonin in immuno-enhancement: potential application in cancer. *International journal of experimental pathology* 2006; 87(2): 81-87.
 242. Bartsch C, Bartsch H, Schmidt A, Ilg S, Bichler K-H, Flüchter S-H. Melatonin and 6-sulfatoxymelatonin circadian rhythms in serum and urine of primary prostate cancer patients: evidence for reduced pineal activity and relevance of urinary determinations. *Clinica chimica acta* 1992; 209(3): 153-167.
 243. Bartsch C, Bartsch H, Fuchs U, Lippert TH, Bellmann O, Gupta D. Stage-dependent depression of melatonin in patients with primary breast cancer. *Cancer* 1989; 64(2): 426-433.
 244. Proietti S, Cucina A, Reiter RJ, Bizzarri M. Molecular mechanisms of melatonin's inhibitory actions on breast cancers. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2013; 70(12): 2139-2157.
 245. Bizzarri M, Proietti S, Cucina A, Reiter RJ. Molecular mechanisms of the proapoptotic actions of melatonin in cancer: a review. *Expert opinion on therapeutic targets* 2013; 17(12): 1483-1496.
 246. Cutando A, Gómez-Moreno G, Arana C, Acuña-Castroviejo D, Reiter RJ. Melatonin: potential functions in the oral cavity. *Journal of periodontology* 2007; 78(6): 1094-1102.
 247. Boyce BF, Schwarz EM, Xing L. Osteoclast precursors: cytokine-stimulated immunomodulators of inflammatory bone disease. *Current opinion in rheumatology* 2006; 18(4): 427-432.
 248. Kumasaka S, Shimozuma M, Kawamoto T, Mishima K, Tokuyama R, Kamiya Y, Davaadorj P, Saito I, Satomura K. Possible involvement of melatonin in tooth development: expression of melatonin 1a receptor in human and mouse tooth germs. *Histochemistry and cell biology* 2010; 133(5): 577-584.

249. Mechin J, Toury C. Action of cariogenic diet on fixation and retention of skeleton and teeth strontium in rats. *Revue d'odonto-stomatologie* 1973; 20(1): 55.
250. Yeh C-M, Lin C-W, Yang J-S, Yang W-E, Su S-C, Yang S-F. Melatonin inhibits TPA-induced oral cancer cell migration by suppressing matrix metalloproteinase-9 activation through the histone acetylation. *Oncotarget* 2016.
251. Lin F-Y, Lin C-W, Yang S-F, Lee W-J, Lin Y-W, Lee L-M, Chang J-L, Weng W-C, Lin C-H, Chien M-H. Interactions between environmental factors and melatonin receptor type 1a polymorphism in relation to oral cancer susceptibility and clinicopathologic development. *PloS one* 2015; 10(3): 1-13.
252. Chaiyarit P, Ma N, Hiraku Y, Pinlaor S, Yongvanit P, Jintakanon D, Murata M, Oikawa S, Kawanishi S. Nitrate and oxidative DNA damage in oral lichen planus in relation to human oral carcinogenesis. *Cancer science* 2005; 96(9): 553-559.
253. Balci Yuce H, Karatas O, Aydemir Turkal H, Pirim Gorgun E, Ocakli S, Benli I, Cayli S. The Effect of Melatonin on Bone Loss, Diabetic Control and Apoptosis in Diabetic Rats With Ligature-Induced Periodontitis. *Journal of periodontology* 2015; 87(4): 35-43.
254. Kose O, Arabaci T, Kara A, Yemenoglu H, Kermen E, Kizildag A, Gedikli S, Ozkanlar S. Effects of Melatonin on Oxidative Stress Index and Alveolar Bone Loss in Diabetic Rats With Periodontitis. *Journal of periodontology* 2016; 87(5): 82-90.
255. Arabacı T, Kermen E, Özkanlar S, Köse O, Kara A, Kızıldağ A, Duman ŞB, İbişoğlu E. Therapeutic effects of melatonin on alveolar bone resorption after experimental periodontitis in rats: a biochemical and immunohistochemical study. *Journal of periodontology* 2015; 86(7): 874-881.
256. Cutando A, Montero J, Gómez-de Diego R, Ferrera M-J, Lopez-Valverde A. Effect of topical application of melatonin on serum levels of C-reactive protein (CRP), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in patients with type 1 or type 2 diabetes and periodontal disease. *Journal of clinical and experimental dentistry* 2015; 7(5): 628-641.
257. Cutando A, López-Valverde A, de Diego RG, de Vicente J, Reiter R, Fernández MH, Ferrera MJ. Effect of topical application of melatonin to the gingiva on salivary osteoprotegerin, RANKL and melatonin levels in patients with diabetes and periodontal disease. *Odontology* 2014; 102(2): 290-296.
258. Cutando A, López-Valverde A, Gómez-de-Diego R, Arias-Santiago S, de Vicente-Jiménez J. Effect of gingival application of melatonin on alkaline and acid phosphatase, osteopontin and osteocalcin in patients with diabetes and periodontal disease. *Medicina oral, patología oral y cirugía bucal* 2013; 18(4): 657-663.
259. Özdem M, Kırzioğlu FY. The effect of melatonin on periodontal bone destruction and oxidative stress parameters in experimental periodontitis. *SDU Journal of Health Science Institute* 2012; 3(1): 58-58.

260. Abdolsamadi H, Goodarzi MT, Motemayel FA, Jazaeri M, Feradmal J, Zarabadi M, Hoseyni M, Torkzaban P. Reduction of melatonin level in patients with type II diabetes and periodontal diseases. *Journal of dental research, dental clinics, dental prospects* 2014; 8(3): 160-170.
261. Almughrabi O, Marzouk K, Hasanato R, Shafik S. Melatonin levels in periodontal health and disease. *Journal of periodontal research* 2013; 48(3): 315-321.
262. Gómez-Moreno G, Cutando-Soriano A, Arana C, Galindo P, Bolaños J, Acuña-Castroviejo D, Wang HL. Melatonin expression in periodontal disease. *Journal of periodontal research* 2007; 42(6): 536-540.
263. Proksch S, Strobel SL, Vach K, Abouassi T, Tomakidi P, Ratka-Krüger P, Hellwig E. Melatonin as a candidate therapeutic drug for protecting bone cells from chlorhexidine-induced damage. *Journal of periodontology* 2014; 85(12): 379-389.
264. Rodríguez-Lozano FJ, García-Bernal D, de los Ángeles Ros-Roca M, del Carmen Algueró M, Onate-Sánchez RE, Camacho-Alonso F, Moraleda JM. Cytoprotective effects of melatonin on zoledronic acid-treated human mesenchymal stem cells in vitro. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 2015; 43(6): 855-862.
265. Elgammal MYA, Salem AS, Anees MM, Tawfik MA. Clinical and Radiographic Evaluation of Immediate Loaded Dental Implants with Local Application of Melatonin: A Preliminary Randomized Controlled Clinical Trial. *Journal of Oral Implantology* 2015; 42(2): 119-125.
266. Cobo-Vázquez C, Fernández-Tresguerres I, Ortega-Aranegui R, López-Quiles J. Effects of local melatonin application on post-extraction sockets after third molar surgery. A pilot study. *Medicina oral, patología oral y cirugía bucal* 2014; 19(6): 628-635.
267. Cutando A, Arana C, Gomez-Moreno G, Escames G, Lopez A, Ferrera MJ, Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D. Local application of melatonin into alveolar sockets of beagle dogs reduces tooth removal-induced oxidative stress. *Journal of periodontology* 2007; 78(3): 576-583.
268. Calvo-Guirado JL, Aguilar Salvatierra A, Gargallo-Albiol J, Delgado-Ruiz RA, Maté Sanchez JE, Satorres-Nieto M. Zirconia with laser-modified microgrooved surface vs. titanium implants covered with melatonin stimulates bone formation. Experimental study in tibia rabbits. *Clinical oral implants research* 2015; 26(12): 1421-1429.
269. Calvo-Guirado JL, Gómez-Moreno G, Maté-Sánchez JE, López-Marí L, Delgado-Ruiz R, Romanos GE. New bone formation in bone defects after melatonin and porcine bone grafts: experimental study in rabbits. *Clinical oral implants research* 2015; 26(4): 399-406.

270. Ramírez-Fernández MP, Calvo-Guirado JL, de-Val JE-MS, Delgado-Ruiz RA, Negri B, Pardo-Zamora G, Peñarrocha D, Barona C, Granero JM, Alcaraz-Baños M. Melatonin promotes angiogenesis during repair of bone defects: a radiological and histomorphometric study in rabbit tibiae. *Clinical oral investigations* 2013; 17(1): 147-158.
271. Tresguerres IF, Clemente C, Blanco L, Khraisat A, Tamimi F, Tresguerres JA. Effects of local melatonin application on implant osseointegration. *Clinical implant dentistry and related research* 2012; 14(3): 395-399.
272. Cutando A, Gómez-Moreno G, Arana C, Muñoz F, Lopez-Peña M, Stephenson J, Reiter RJ. Melatonin stimulates osteointegration of dental implants. *Journal of pineal research* 2008; 45(2): 174-179.
273. Guardia J, Gómez-Moreno G, Ferrera MJ, Cutando A. Evaluation of effects of topic melatonin on implant surface at 5 and 8 weeks in Beagle dogs. *Clinical implant dentistry and related research* 2011; 13(4): 262-268.
274. Liu J, Zhou H, Fan W, Dong W, Fu S, He H, Huang F. Melatonin influences proliferation and differentiation of rat dental papilla cells in vitro and dentine formation in vivo by altering mitochondrial activity. *Journal of pineal research* 2013; 54(2): 170-178.
275. Li J-G, Lin J-J, Wang Z-L, Cai W-K, Wang P-N, Jia Q, Zhang A-S, Wu G-Y, Zhu G-X, Ni L-X. Melatonin attenuates inflammation of acute pulpitis subjected to dental pulp injury. *American journal of translational research* 2015; 7(1): 66-75.
276. Farhad AR, Razavi S, Jahadi S, Saatchi M. Use of aminoguanidine, a selective inducible nitric oxide synthase inhibitor, to evaluate the role of nitric oxide in periapical inflammation. *Journal of oral science* 2011; 53(2): 225-230.
277. Brown JH, Brenn L. A method for the differential staining of Gram-positive and Gram-negative bacteria in tissue sections. *Bull Johns Hopkins Hosp* 1931; 48:69-73.
278. Luna LG. *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. 3 Ed., New York: Mcgraw Hill, 1968; 222-223.
279. De Rossi A, Rocha LB, Rossi MA. Interferon-gamma, interleukin-10, intercellular adhesion molecule-1, and chemokine receptor 5, but not interleukin-4, attenuate the development of periapical lesions. *Journal of endodontics* 2008; 34(1): 31-38.
280. Wolle CFB, de Aguiar Zollmann L, Etges A, Vitalis GS, Leite CE, Campos MM. Effects of the antioxidant agent tempol on periapical lesions in rats with doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Journal of endodontics* 2012; 38(2): 191-195.
281. Liu L, Zhang C, Hu Y, Peng B. Protective effect of metformin on periapical lesions in rats by decreasing the ratio of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand/osteoprotegerin. *Journal of endodontics* 2012; 38(7): 943-947.

282. Wayama MT, Yoshimura H, Ohba S, Yoshida H, Matsuda S, Kobayashi J, Kobayashi M, Gomes Filho JE, Sano K. Diminished Progression of Periapical Lesions with Zoledronic Acid in Ovariectomized Rats. *Journal of endodontics* 2015; 41(12): 2002-2007.
283. Suzuki N, Takimoto K, Kawashima N. Cathepsin K Inhibitor Regulates Inflammation and Bone Destruction in Experimentally Induced Rat Periapical Lesions. *Journal of endodontics* 2015; 41(9): 1474-1479.
284. Hao L, Chen W, McConnell M, Zhu Z, Li S, Reddy M, Eleazer PD, Wang M, Li Y-P. A small molecule, Odanacatib, inhibits inflammation and bone loss caused by endodontic disease. *Infection and immunity* 2015; 83(4): 1235-1245.
285. Gomes-Filho J, Wayama M, Dornelles R, Ervolino E, Yamanari G, Lodi C, Sivieri-Araújo G, Dezan-Júnior E, Cintra L. Raloxifene modulates regulators of osteoclastogenesis and angiogenesis in an oestrogen deficiency periapical lesion model. *International endodontic journal* 2015; 48(11): 1059-1068.
286. Gomes-Filho JE, Wayama MT, Dornelles RCM, Ervolino E, Coclete GA, Duarte PCT, Yamanari GH, Lodi CS, Dezan-Júnior E, Cintra LTA. Effect of raloxifene on periapical lesions in ovariectomized rats. *Journal of endodontics* 2015; 41(5): 671-675.
287. Di Paola R, Mazzon E, Zito D, Maiere D, Britti D, Genovese T, Cuzzocrea S. Effects of Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, in a rodent model periodontitis. *Journal of clinical periodontology* 2005; 32(10): 1062-1068.
288. Mai QG, Zhang ZM, Xu S, Lu M, Zhou RP, Zhao L, Jia CH, Wen ZH, Jin DD, Bai XC. Metformin stimulates osteoprotegerin and reduces RANKL expression in osteoblasts and ovariectomized rats. *Journal of cellular biochemistry* 2011; 112(10): 2902-2909.
289. Lee Y-S, Kim Y-S, Lee S-Y, Kim G-H, Kim B-J, Lee S-H, Lee K-U, Kim G-S, Kim S-W, Koh J-M. AMP kinase acts as a negative regulator of RANKL in the differentiation of osteoclasts. *Bone* 2010; 47(5): 926-937.
290. Ahn SG, Kim SH, Lee HM, Lee SA, Jeong J. Survival benefit of zoledronic acid in postmenopausal breast cancer patients receiving aromatase inhibitors. *Journal of breast cancer* 2014; 17(4): 350-355.
291. Costa AG, Cusano NE, Silva BC, Cremers S, Bilezikian JP. Cathepsin K: its skeletal actions and role as a therapeutic target in osteoporosis. *Nature Reviews Rheumatology* 2011; 7(8): 447-456.
292. Kato S. Molecular mechanism of tissue-specific actions of SERM. *Clinical calcium* 2006; 16(9): 1469-1474.
293. Taranta A, Brama M, Teti A, Scandurra R, Spera G, Agnusdei D, Termine J, Migliaccio S. The selective estrogen receptor modulator raloxifene regulates osteoclast and osteoblast activity in vitro. *Bone* 2002; 30(2): 368-376.
294. Orozco C, Maalouf NM. Safety of bisphosphonates. *Rheumatic Disease Clinics of North America* 2012; 38(4): 681-705.

295. Barrett-Connor E, Mosca L, Collins P, Geiger MJ, Grady D, Kornitzer M, McNabb MA, Wenger NK. Effects of raloxifene on cardiovascular events and breast cancer in postmenopausal women. *New England Journal of Medicine* 2006; 355(2): 125-137.
296. Martino S, Cauley JA, Barrett-Connor E, Powles TJ, Mershon J, Disch D, Secrest RJ, Cummings SR, Investigators C. Continuing outcomes relevant to Evista: breast cancer incidence in postmenopausal osteoporotic women in a randomized trial of raloxifene. *Journal of the National Cancer Institute* 2004; 96(23): 1751-1761.
297. Antolín I, Obst B, Burkhardt S, Hardeland R. Antioxidative protection in a high-melatonin organism: The dinoflagellate *Gonyaulax polyedra* is rescued from lethal oxidative stress by strongly elevated, but physiologically possible concentrations of melatonin. *Journal of pineal research* 1997; 23(4): 182-190.
298. Liu L, Peng B. The expression of macrophage migration inhibitory factor is correlated with receptor activator of nuclear factor kappa B ligand in induced rat periapical lesions. *Journal of endodontics* 2013; 39(8): 984-989.
299. Sousa NGK, de Barros Cardoso CR, da Silva JS, Kuga MC, Tanomaru-Filho M, Faria G. Association of matrix metalloproteinase inducer (EMMPRN) with the expression of matrix metalloproteinases-1,-2 and-9 during periapical lesion development. *Archives of oral biology* 2014; 59(9): 944-953.
300. Wagner C, Barth VC, de Oliveira SD, Campos MM. Effectiveness of the proton pump inhibitor omeprazole associated with calcium hydroxide as intracanal medication: an in vivo study. *Journal of endodontics* 2011; 37(9): 1253-1257.
301. De Paula-Silva FWG, Júnior MS, Leonardo MR, Consolaro A, da Silva LAB. Cone-beam computerized tomographic, radiographic, and histologic evaluation of periapical repair in dogs' post-endodontic treatment. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 2009; 108(5): 796-805.
302. Tanomaru JMG, Leonardo MR, Tanomaru-Filho M, Silva LABd, Ito IY. Microbial distribution in the root canal system after periapical lesion induction using different methods. *Brazilian dental journal* 2008; 19(2): 124-129.
303. Fouad A, Walton R, Rittman B. Induced periapical lesions in ferret canines: histologic and radiographic evaluation. *Dental Traumatology* 1992; 8(2): 56-62.
304. Garlet TP, Fukada SY, Saconato IF, Avila-Campos MJ, da Silva TA, Garlet GP, Cunha Fde Q. CCR2 deficiency results in increased osteolysis in experimental periapical lesions in mice. *Journal of endodontics* 2010; 36(2): 244-250.
305. Aranha AMF, Repeke CE, Garlet TP, Vieira AE, Campanelli AP, Trombone APF, Letra A, Silva RM, Garlet GP. Evidence supporting a protective role for th9 and th22 cytokines in human and experimental periapical lesions. *Journal of endodontics* 2013; 39(1): 83-87.

306. Stashenko P, Wang C-Y, Tani-Ishii N, Yu SM. Pathogenesis of induced rat periapical lesions. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology* 1994; 78(4): 494-502.
307. Huxley H. The histology of rat molar tooth fissure plaque. *Archives of oral biology* 1971; 16(11): 1311-1311.
308. Ertuğrul İF, Maden M, Orhan EO. Endodontik çalışmalarda deney hayvanlarının kullanımı ve seçim kriterleri. *SDÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 2013; 4(2).
309. Dammaschke T. Rat molar teeth as a study model for direct pulp capping research in dentistry. *Laboratory animals* 2010; 44(1): 1-6.
310. Gibbs RA, Weinstock GM, Metzker ML, Muzny DM, Sodergren EJ, Scherer S, Scott G, Steffen D, Worley KC, Burch PE. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature* 2004; 428(6982): 493-521.
311. Fukada S, Silva T, Saconato I, Garlet G, Avila-Campos M, Silva J, Cunha F. iNOS-derived nitric oxide modulates infection-stimulated bone loss. *Journal of dental research* 2008; 87(12): 1155-1159.
312. Chuang FH, Tsai CC, Chen JH, Chen KK, Chen YK, Lin YC. Long-term sequential receptor activator of NF-κB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) expression in lipopolysaccharide-induced rat periapical lesions. *Journal of Oral Pathology & Medicine* 2012; 41(2): 186-193.
313. Liu L, Wang L, Wu Y, Peng B. The expression of MCP-1 and CCR2 in induced rats periapical lesions. *Archives of oral biology* 2014; 59(5): 492-499.
314. Zhang R, Huang S, Wang L, Peng B. Histochemical Localization of Dickkopf-1 in Induced Rat Periapical Lesions. *Journal of endodontics* 2014; 40(9): 1394-1399.
315. Lin SK, Kok SH, Lin LD, Wang CC, Kuo M, Lin CT, Hsiao M, Hong CY. Nitric oxide promotes the progression of periapical lesion via inducing macrophage and osteoblast apoptosis. *Oral microbiology and immunology* 2007; 22(1): 24-29.
316. Teixeira RC, Rubira CMF, Assis GF, Lauris JRP, Cestari TM, Rubira-Bullen IRF. Radiological and histopathological evaluation of experimentally-induced periapical lesion in rats. *Journal of applied oral science* 2011; 19(5): 500-504.
317. Da Silva RAB, Ferreira PDF, De Rossi A, Nelson-Filho P, Silva LAB. Toll-like receptor 2 knockout mice showed increased periapical lesion size and osteoclast number. *Journal of endodontics* 2012; 38(6): 803-813.
318. Silva M, Sousa L, Lara V, Cardoso F, Júnior G, Totola A, Caliarı M, Romero O, Silva G, Ribeiro-Sobrinho A. The role of iNOS and PHOX in periapical bone resorption. *Journal of dental research* 2011; 90(4): 495-500.

319. De Oliveira KM, da Silva RA, De Rossi A, Fukada SY, Feres M, Nelson-Filho P, da Silva LA. Absence of interleukin 22 affects the oral microbiota and the progression of induced periapical lesions in murine teeth. *International endodontic journal* 2015; 48(1): 46-59.
320. Bezerra da Silva R, Nelson-Filho P, Lucisano M, De Rossi A, Queiroz A, Bezerra da Silva L. MyD88 knockout mice develop initial enlarged periapical lesions with increased numbers of neutrophils. *International endodontic journal* 2014; 47(7): 675-686.
321. Lu Y, Xiao G, Galson DL, Nishio Y, Mizokami A, Keller ET, Yao Z, Zhang J. PTHrP-induced MCP-1 production by human bone marrow endothelial cells and osteoblasts promotes osteoclast differentiation and prostate cancer cell proliferation and invasion in vitro. *International journal of cancer* 2007; 121(4): 724-733.
322. Kim MS, Magno CL, Day CJ, Morrison NA. Induction of chemokines and chemokine receptors CCR2b and CCR4 in authentic human osteoclasts differentiated with RANKL and osteoclast like cells differentiated by MCP-1 and RANTES. *Journal of cellular biochemistry* 2006; 97(3): 512-518.
323. Ricucci D, Siqueira JF, Bate AL, Ford TRP. Histologic investigation of root canal-treated teeth with apical periodontitis: a retrospective study from twenty-four patients. *Journal of endodontics* 2009; 35(4): 493-502.
324. Chiplunkar S, Langhorne J, Kaufmann S. Stimulation of B cell growth and differentiation by murine recombinant interleukin 1. *The Journal of Immunology* 1986; 137(12): 3748-3752.
325. Mizel SB. Interleukin 1 and T cell activation. *Immunological reviews* 1982; 63(1): 51-72.
326. Westmacott D, Wadsworth J, Bloxham D. Chemotactic activity of recombinant human interleukin-1. *Inflammation Research* 1987; 21(3): 323-324.
327. Sauder DN, Mounessa NL, Katz SI, Dinarello CA, Gallin J. Chemotactic cytokines: the role of leukocytic pyrogen and epidermal cell thymocyte-activating factor in neutrophil chemotaxis. *The Journal of Immunology* 1984; 132(2): 828-832.
328. Vernal R, Dezerega A, Dutzan N, Chaparro A, León R, Chandía S, Silva A, Gamonal J. RANKL in human periapical granuloma: possible involvement in periapical bone destruction. *Oral diseases* 2006; 12(3): 283-289.
329. Martinho FC, Chiesa WM, Leite FR, Cirelli JA, Gomes BP. Correlation between clinical/radiographic features and inflammatory cytokine networks produced by macrophages stimulated with endodontic content. *Journal of endodontics* 2012; 38(6): 740-745.
330. Kong Y-Y, Yoshida H, Sarosi I, Tan H-L, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliveira-dos-Santos AJ, Van G, Itie A. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 1999; 397(6717): 315-323.

331. Menezes R, Bramante CM, da Silva Paiva KB, Letra A, Carneiro E, Zambuzzi WF, Granjeiro JM. Receptor activator NF κ B-ligand and osteoprotegerin protein expression in human periapical cysts and granulomas. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 2006; 102(3): 404-409.
332. Sabeti M, Simon J, Kermani V, Valles Y, Rostein I. Detection of Receptor Activator of NF- κ β Ligand in Apical Periodontitis. *Journal of endodontics* 2005; 31(1): 17-18.
333. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *Journal of Bone and Mineral Research* 2000; 15(1): 2-12.
334. Glantschnig H, Fisher J, Wesolowski G, Rodan G, Reszka A. M-CSF, TNF α and RANK ligand promote osteoclast survival by signaling through mTOR/S6 kinase. *Cell Death & Differentiation* 2003; 10(10): 1165-1177.
335. Zaidi M, Blair HC, Moonga BS, Abe E, Huang CLH. Osteoclastogenesis, Bone Resorption, and Osteoclast-Based Therapeutics. *Journal of Bone and Mineral Research* 2003; 18(4): 599-609.
336. Minkin C. Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcified tissue international* 1982; 34(1): 285-290.



EKLER

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	ERDAL	Soyadı	SARITEKİN
Doğum Yeri	Osmaniye	Doğum Tarihi	1985
Uyruğu	Türkiye Cumhuriyeti		
E-mail	erdalsaritekin@hotmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurum	Mezuniyet Yılı
Doktora	SDÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2016
Yüksek Lisans	SDÜ Diş Hekimliği Fakültesi	2008
Lisans	SDÜ Diş Hekimliği Fakültesi	2008
Lise	Dervişpaşa Lisesi	2003

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre(Yıl-Yıl)
Doktora Öğrencisi / Diş Hekimi	SDÜ Diş Hekimliği Fakültesi	2009-2016

Yabancı Dilleri	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	68,75 - İyi	-

ETİK KURUL ONAYI



T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı

SAYI : 21438139 - 138
KONU: Etik Kurul Kararı

05/06/2014

SAYIN
Doç. Dr. Bulem ÜREYEN KAYA
(SDÜ Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti A.D.)

“Melatoninin deneysel olarak oluşturulan periapikal lezyon üzerine etkisi” konulu projeniz Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından **05 HAZİRAN 2014** tarih ve **01** sayılı kararı ile uygun bulunmuştur. Kararın bir örneği ekte sunulmuştur. Bilgilerinize rica ederim.

Doç. Dr. Erkan UZ
SDÜ-HADYEK Başkanı

Ek: 1 Adet HADYEK Kararı

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı

TOPLANTI TARİHİ	TOPLANTI SAYISI	KARAR SAYISI
05.06.2014	17	01

Süleyman Demirel Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 05 HAZİRAN 2014 tarihinde Saat 14:00'da toplanarak aşağıdaki kararları almıştır,

Süleyman Demirel Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti A.D. Öğretim Üyesi Doç. Dr. Bülent ÜREYEN KAYA'nın yürütücüsü olduğu Prof. Dr. Özlem ÖZMEN, Yrd. Doç. Dr. Halil AŞÇI, Dt. Erdal SARITEKİN'in yardımcı araştırmacı olarak yer aldığı, "Melatoninin deneysel olarak oluşturulan periapikal lezyon üzerine etkisi" başlıklı çalışma;

Deneysel Hayvanın Türü	Cinsiyeti	Sayısı	Yaşı
Sıçan (Sprague Dawley)	Erkek	30+2=32	250 – 350gr

Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından oy birliği ile UYGUN görülmüştür.

Doç. Dr. Ekan UZ BAŞKAN	Prof. Dr. Münire ÇAKIR BAŞKAN YARDIMCISI	Doç. Dr. İ. Metin ÇIRIŞ ÜYE
		
Yrd. Doç. Dr. Pınar ASLAN KOŞAR ÜYE	Yrd. Doç. Dr. Gülnur ÖZGÜNER ÜYE	Yrd. Doç. Dr. Müge ÇINA AKSOY ÜYE
KATILMADI		
Öğr. Gör. İbrahim ONARAN ÜYE	Vet. Hekim İsmail UZ ÜYE	Ecz. Mustafa Serhan DERYAL ÜYE
	KATILMADI	KATILMADI

PROJE ONAYI

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİ
PROTOKOLÜ

Toplantı Tarihi : 23.09.2014

Toplantı No: 2014/05

Proje Türü : Doktora Tezi
Proje No : 4076-D1-14
Proje Yöneticisi : Doç. Dr. Bulem ÜREYEN KAYA
Yöneticinin Adresi : Diş Hekimliği Fakültesi , Klinik Diş Hekimliği Bilimleri
Proje Başlığı : Melatoninin Deneysel Olarak Oluşturulan Periapikal Lezyon Üzerine Etkisi

Yayın Şartı : SCI/SSCI/AHCI İndeksi Dışındaki İndekslere Giren Yayın
Proje Bütçesi (TL) : 14.990,08
Proje süresi : Başlangıç Tarihi : 13.10.2014 Bitiş Tarihi: 13.10.2015 - 12 ay

TARAFILAR:

1. Süleyman Demirel Üniversitesi adına hareket eden Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyon Başkanı ile Proje Yöneticisi sıfatı ile hareket eden Diş Hekimliği Fakültesi Klinik Diş Hekimliği Bilimleri adresinde çalışan görevli Doç. Dr. Bulem ÜREYEN KAYA aşağıdaki şartlarla bir araştırma projesi destekleme protokolü yapılmıştır.

Protokolde S.D.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Komisyonu'na kısaca "BAP Komisyonu", Doç. Dr. Bulem ÜREYEN KAYA kısaca "Proje Yöneticisi" diye anılacaktır.

PROTOKOLÜN KONUSU:

2. Bu protokolün Konusu ekli Bilimsel Araştırma Projesi müracaat formunda ayrıntıları belirtilmiş "Melatoninin Deneysel Olarak Oluşturulan Periapikal Lezyon Üzerine Etkisi ." Adlı projenin Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından bu protokole belirtildiği şekilde desteklenmesidir.

PROJE YÖNETİCİSİNİN GÖREVLERİ:

3. Projenin protokole ekli araştırma projesi müracaat formunda belirtilen program içinde protokoldeki süre, amaç ve şartlara uygun olarak yürütülmesi, geliştirilmesi ve sonuçlandırılmasından proje yöneticisi sorumludur.

Desteklenmesi teklif ve kabul edilmiş projenin amaç, kapsam, süre, program ve bütçesinde BAP Komisyonunun yazılı izni alınmadan hiçbir değişiklik yapılamaz.

PROJE YARDIMCI PERSONELİNİN GÖREVLERİ

4. Yüksek lisans, doktora ve tıpta uzmanlık projelerinde yardımcı personel olarak görev alan lisansüstü öğrenciler bu protokolün 3. maddesi 1. paragrafındaki belirtilen şartlar için sorumludur.

ARAÇ GEREÇ VE DONATIM:

5. Proje için Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından sağlanan araç, gereç ve donatımın (kullanılması tamamen tüketilmesine bağlı olanlar hariç) mülkiyeti BAP Koordinasyon Birimine aittir. Projenin bitiminde mülkiyet hakkı saklı kalmak üzere bu türlü araç, gereç ve donatımın proje yöneticisi elinde bırakılması veya geri alınması BAP Komisyonu tarafından ayrıca karara bağlanır. Proje için sağlanmış ve tahsis edilmiş araç, gereç ve donatımın iyi şekilde muhafazasından, gerekli bakım ve onarımlarından proje yöneticisi sorumludur.

RAPORLAR

6. Proje yöneticisi projenin devamı süresince her 6 (altı) ayda bir çalışmalarının gidişi ve harcama durumlarıyla ilgili bir gelişme raporu ve ayrıca istenildiğinde proje ile ilgili ayrıntılı bilgileri BAP Komisyonuna vermekle yükümlüdür. Gelişme raporları 6 ayda bir verilmeyen projelerde harcama yaptırılmayacaktır.

BAP Komisyonu gerekli görürse projeye ilgili çalışmaları çalışma yerinde inceleyebilir. Bu durumlarda proje yöneticisi projeye ilgili her türlü teknik, idari ve mali bilgileri ve belgeleri incelemeye hazır bulundurmak ve incelemeyi kolaylaştıracak bütün yardımları yapmakla görevlidir.

Gelişme Rapor Tarihleri

I. Gelişme Rapor Tarihi: **12.04.2015** II. Gelişme Rapor Tarihi: **13.10.2015** III. Gelişme Rapor Tarihi: **12.04.2016**
IV. Gelişme Rapor Tarihi: **12.10.2016** V. Gelişme Rapor Tarihi: **10.04.2017** VI. Gelişme Rapor Tarihi: **07.10.2017**

7. PROJEDE GÖREV ALAN YARDIMCI PERSONELLER

Erdal SARITEKİN

KESİN RAPOR

8. Proje yöneticisi projenin bitiminde bütün teknik ayrıntıları ve belgeleri kapsayan kesin raporu hazırlayarak BAP Komisyonu'na vermekle yükümlüdür.

Ayrıca Proje sonuçlarını ihtiva eden ve Süleyman Demirel Üniversitesi bilimsel makale esaslarına uygun biçimde hazırlanmış bir makaleyi de üniversitenin periyodik yayınlarında yayınlamak üzere kesin raporla birlikte göndermekle görevlidir.

Ayrıca, yönetici isterse makalesini yurtdışında herhangi bir dergide Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklendiği atıfta bulunularak yayınlatılabilir.

GÜVENLİK TEDBİRLERİ:

9. Proje Yöneticisi, proje yerinde kazaları önleme ve sağlık şartları bakımından iş kanunu ve sosyal sigortalar kanunu ve ilgili diğer kanun, tüzük ve yönetmeliklere göre gerekli her türlü güvenlik tedbirlerinin alınmasından sorumludur.

GİZLİLİK:

10. Proje Yöneticisi, projeye ilgili olarak elde edilecek bilgilerin gizliliğinin korunması bakımından BAP Komisyonuna karşı sorumludur.

Proje kesin raporu BAP Komisyonu kabul ve durum tebliğ edilinceye kadar, proje yöneticisi veya projede çalışan diğer personel tarafından BAP Komisyonundan izin alınmadan, projeye ilgili haber veya beyanat verilemez, yayın yapılamaz, rapor açıklanamaz.

PERSONEL VE HARCAMALAR:

11. Projede çalışacak laborant ve teknisyen gibi yardımcı personel ile tam zamanlı araştırmacılar proje yöneticisi tarafından bulunup seçilir ve proje müracaat formüller neticesinde görevlendirilir

Bu elamanlara yapılacak ödemeler ve proje bakımından gerekli başka harcamalar proje yöneticisi tarafından, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Biriminden alınacak avanstaki karşılanabilir.. Ücretler ve ödemelerden yapılacak gelir vergisi, sigorta primi, damga vergisi gibi her türlü kesintilerin yapılmasından ve gerekli mercilere yatırılmasından proje yöneticisi sorumludur.

*** DESTEK MİKTARI:**

12. Projeyi desteklemek amacıyla BAP Koordinasyon Biriminden, ayrıntıları protokole ekli araştırma projesi müracaat formunda gösterilen toplam 14.990,08 TL destek sağlanacaktır

ÖDEMENİN KESİLMESİ:

13. Sözleşme gereğince yapılan ödemelerin, proje amaç ve programına, sözleşme şartlarına uygun olarak kullanılmadığı; gelişme raporlarından istenen ayrıntılı bilgilerden, yapılan incelemelerden veya başka şekillerde anlaşılırsa veya proje gelişme raporları yapılan hatırlatmaya rağmen zamanında verilmez ise, başkaca ihbara lüzum kalmadan sözleşme gereğince yapılan ödemeler durdurulabilir. Başka talepler saklı kalmak üzere verilmiş araç, gereç, donatım derhal geri alınır. O güne kadar yapılmış tüm harcamalar sorumlulara faizi ile birlikte ödetilir.

YÜRÜRLÜLÜK SÜRESİ:

14. Bu Protokol 13.10.2014 tarihinden 13.10.2015 tarihine kadar yürürlüktedir.

PROTOKOLUN UZAMASI:

15. Protokol süresinin uzatılması, uzatmanın proje yöneticisi tarafından protokol süresinin bitimi tarihinden 1 ay önce teklif edilmesine ve BAP Komisyonu tarafından uygun görülerek bu konudaki esaslar gereğince kararlaştırılmasına bağlıdır.

GÖREV YERİNİN DEĞİŞTİRİLMESİ:

16. Bu Protokolle ilgili yazışma ve tebligat birinci maddede yazılı adrese yapılır. Proje yöneticisi adresini değiştirdiği takdirde bunu en geç 10 gün içinde BAP Komisyonuna bildirmeye mecburdur. Görev yeri değişikliği bildirilmezse eski görev yerine gönderilen yazı ve tebligat o görev yerinde yapılmış sayılır.

PROTOKOL GİDERLERİ:

17. Protokol giderleri proje yöneticisine aittir

YETKİLİ MERCİ:

18. Anlaşmazlık halinde yetkili merci, Isparta Mahkeme ve icra müdürlükleridir.

47

Proje Yardımcı Personeli
Erdal SARITEKİN



Proje Yöneticisi
Doç. Dr. Bülent ÜREYEN KAYA

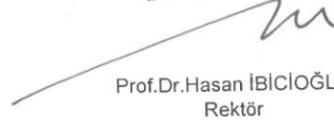


Prof.Dr.Mehmet Sengiz KAYACAN
Rektör Yardımcısı
BAP Komisyon Başkanı



UYGUNDUR

26.10.2014.....



Prof.Dr.Hasan İBİCİOĞLU
Rektör