



T.C.
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

**DENEYSEL PERİODONTİTİS OLUŞTURULAN SIÇANLARDA
HİDROKSİTİROSOL'ÜN ALVEOLAR KEMİK YIKIMI VE OKSİDATİF
STRES PARAMETRELERİNE OLAN ETKİSİ**

Dt. Mehmet Cihan ŞENGÜN

PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Doktor Öğretim Üyesi Şadiye GÜNPINAR

Bu çalışma Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından desteklenmiştir
(Proje numarası: 2017.06.05.1144).

MART 2018
BOLU

T.C.
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
Tez Onay Belgesi

Tezin Başlığı : Deneysel Periodontitis Oluşturulan Sıçanlarda
Hidroksitirosoil'ün Alveolar Kemik Yıkımı ve Oksidatif
Tezin Savunma Tarihi : Stres Parametrelerine Olan Etkisi
26.03.2018
Tezin Danışmanı : Doktor Öğretim Üyesi Şadiye Günpınar

Jüri Başkanı

: Tamer Atayın

Üye

: Gulbahar USTAOGU

Üye

: Şadiye Günpınar

DEKANLIK ONAYI

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Hasan ORUÇOĞLU

DEKAN V.

ÖZET

Hidroksitirozol (HT) esas olarak antioksidan aktiviteye sahip, hücre koruyucu özellikleri ile sağlığa faydalı bir polifenoldür. Antienflamatuvar ve antikanser özelliklere sahiptir. Endotel ve vasküler fonksiyonlara olumlu etkilerine ek olarak kemik kaybını da azaltmaktadır. Bu nedenlerle, HT kronik hastalıklarla ilişkili moleküler ve hücresel değişiklikler üzerinde olumlu özelliktedir ve önleyici/teravi edici potansiyel bir terapötik maddedir. Bu çalışmanın amacı sıçanlarda sistemik olarak uygulanan HT'nin deneysel periodontitis (DP) üzerine etkilerini araştırmaktır.

Otuz iki adet sıçan rastgele dört gruba ayrıldı; 1) periodontal olarak sağlıklı + serum fizyolojik (PS-SF), 2) periodontal olarak sağlıklı + hidroksitirozol (PS-HT), 3) deneysel periodontitis + serum fizyolojik (DP-SF) ve 4) deneysel periodontitis + hidroksitirozol (DP-HT). Sıçanların maksiller ikinci azı dişlerine ligatür yerleştirilmesi ile DP indüklenmesi sonrasında test grubuna HT, kontrol grubuna SF gavaj yoluyla 14 gün boyunca uygulandı. Sıçanlar 15. günde ötenazi yapılarak çene örnekleri elde edildi. Örnekler biyokimyasal, histolojik, histomorfometrik ve immünohistokimyasal olarak analiz edildi. Serum ve doku malondialdehit (MDA), süperoksit dismutaz (SOD) ve glutasyon peroksidaz (GSH-Px) düzeyleri enzim bağımlı immunosorbent assay (ELISA) ile değerlendirildi. NF-kB ligandı reseptör aktivatörü (RANKL), osteoprotegerin (OPG) seviyeleri ve RANKL/OPG oranı immün boyama ile analiz edildi. İstatistiksel analizlerde varyans analizi (ANOVA)-Tukey ve Kruskal Wallis-Mann Whitney *U* testleri kullanıldı.

Deneysel periodontitis oluşturulan gruplarda periodontal olarak sağlıklı gruplara göre daha fazla alveolar kemik kaybı olduğu ($p<0.05$), diğer taraftan DP-HT ile DP-SF grubu arasında anlamlı farklılığın olmadığı saptandı ($p>0.05$). DP-HT ile DP-SF grupları arasında serum ve doku MDA, SOD ve GSH-Px düzeylerinde anlamlı farklılık tespit edilmedi ($p>0.05$). Bunun yanında PS-HT grubunun doku SOD seviyelerinin PS-SF grubuna göre anlamlı yüksek olduğu belirlendi ($p<0.05$). İmmünokimyasal değerlendirmede, DP oluşturulan grupların RANKL seviyelerinin ve RANKL/OPG oranının, PS gruplara göre anlamlı daha yüksek olduğu ve OPG seviyelerinin ise daha düşük olduğu tespit edildi ($p<0.05$). HT uygulaması yapılan PS-HT ve DP-HT gruplarının RANKL seviyelerinin ve RANKL/OPG oranlarının SF uygulanması yapılan PS-SF ve DP-SF gruplarına göre anlamlı daha az olduğu saptandı ($p<0.05$).

Bu çalışmanın sınırları dahilinde, sistemik HT uygulamasının serum ve doku MDA, SOD ve GSH-Px parametreleri üzerine etkisinin olmadığı, RANKL düzeylerini ve RANKL/OPG oranını azalttığı bu nedenle alveolar kemik kaybını önleyebileceği diğer taraftan bu durumun histomorfometrik ölçümler ile desteklenmediği sonuçları belirlendi.

Anahtar kelimeler: Alveolar Kemik Kaybı, Antioksidan, Deneysel Periodontitis, Hidroksitirozol, Oksidatif Stres.

ABSTRACT

Hydroxytyrosol (HT) is a polyphenol compound which has mainly antioxidant activity and also possesses other cytoprotective properties with beneficial health effects. These include anti-inflammatory, anticancer, endothelial and vascular function improvement. In addition it has been reported that HT can decrease alveolar bone loss. Therefore, HT has crucial effects on molecular and cellular alterations associated with chronic diseases and becomes a potential therapeutic agent for the prevention and/or treatment. The aim of this study was to determine the effects of systemically administered HT on experimental periodontitis (EP) in rats.

Thirty two rats were divided randomly into four groups; 1) periodontally healthy + serum physiologic (PH-SP), 2) periodontally healthy + hydroxytyrosol (PH-HT), 3) experimental periodontitis + serum physiologic (EP-SP) and 4) experimental periodontitis + hydroxytyrosol (EP-HT). Ligatures were placed around maxillary second molars in EP groups. After induction of EP, HT (test) and SP (control) was administered and continued for 14 days. The animals were euthanized on 15th day and the jaws were removed for histopathologic, histomorphometric and immunohistochemical analyses. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to analyse serum and tissue malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) levels. The receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL), osteoprotegerin (OPG) levels and RANKL/OPG ratio were analysed via immunolabeling. Analysis of variance (ANOVA)-Tukey and Kruskal Wallis- Mann Whitney *U* tests were used to analyse the data.

Experimental periodontitis groups had significantly more alveolar bone loss compared to the PH groups ($p < 0.05$). On the other hand, the difference between the EP-HT and the EP-SF groups did not reach significance ($p > 0.05$). Serum and tissue MDA, SOD and GSH-Px levels did not differ between EP-HT and EP-SF groups ($p > 0.05$). Beside, tissue SOD levels of PH-HT group were significantly higher than PH-SF group ($p < 0.05$). Immunohistochemical evaluation showed that higher RANKL levels and RANKL/OPG ratio, and lower OPG levels in EP than PH groups ($p < 0.05$). It was found that RANKL levels and RANKL/OPG ratio in HT applied PH-HT and EP-HT groups were significantly lower than SF applied PH-SF and EP-SF groups ($p < 0.05$).

Within the limits of this study, it was determined that systemically HT application did not effect serum and tissue MDA, SOD and GSH-Px levels. Decreased RANKL levels and RANKL/OPG ratio in HT groups showed that systemically HT administration might prevent alveolar bone loss, on the other hand, this result was not supported by histomorphometric measurements.

Keywords: Alveolar Bone Loss, Antioxidant, Experimental Periodontitis, Hydroxytyrosol, Oxidative Stres.

TEŞEKKÜRLER

İlkokul öğretmenlerimizin okuma yazmayı öğretirken harflerin nasıl yan yana geldiklerini göstermeleri gibi, periodontolojinin temel harflerini yan yana getiren, bu alanda harflerle kelimeler ve kelimelerle cümleler yazmamda büyük katkısı olan, periodontoloji bakış açımın oluşmasını sağlayan değerli danışman hocam Abant İzzet Baysal Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Dr. Öğretim Üyesi Şadiye GÜNPINAR'a, kendisinden çok şey öğrendiğim, yoluma ışık tutan, bilgi ve deneyimlerini hiç esirgmeden paylaşan Periodontoloji Bölüm Başkanı Sayın Hocam Dr. Öğretim Üyesi Gülbahar USTAOĞLU'na ve tüm bölüm hocalarıma,

Tezimin her aşamasında ve tüm hayatım boyunca destek olan, yol gösteren, her daim moral depolayan ve bugün bu adımları atmamı sağlayan fedakâr annem ve babama,

Mesleğe başlamam ile klinik içi, dışı keyifle çalışmamı, gelişmemi ve gülmemi sağlayan bölümümden değerli dostlarım Tuğçe PAKSOY, Mehmet Selim YILDIZ, Kerem Çağlar GÜMÜŞ, Bilge MERACI, dost klinikten Murat CANBOLAT, saf ve temiz kalbiyle deney sürecinde yanımda olan Hüsniye BİLGE'ye,

Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Kliniğimizin değerli personellerine,

SONSUZ TEŞEKKÜRLER...

İÇİNDEKİLER

| | |
|----------------------------------------------------------------------------|-------------|
| ONAY SAYFASI | ii |
| ÖZET | iii |
| ABSTRACT | iv |
| TEŞEKKÜRLER | v |
| İÇİNDEKİLER | vi |
| TABLolar | ix |
| FİGÜRLER | xii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR | xiii |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 5 |
| 2.1. Periodontal Hastalık..... | 5 |
| 2.2. Biyofilm ve Mikrobiyal Plak | 5 |
| 2.3. Antimikrobiyal Savunma..... | 6 |
| 2.4. Alveolar Kemik Yıkımı | 8 |
| 2.5. Reaktif Oksijen Türleri ve Antioksidanlar..... | 9 |
| 2.5.1. Reaktif Oksijen Türleri | 10 |
| 2.5.2. Oksidatif Stres ve Doku Hasarı | 11 |
| 2.5.2.1. Protein Hasarı | 12 |
| 2.5.2.2. DNA Hasarı | 13 |
| 2.5.2.3. Lipid Peroksidasyonu | 13 |
| Malondialdehid | 14 |
| 2.5.3. Antioksidanlar..... | 15 |
| 2.5.3.1. Süperoksit Dismütaz | 17 |
| 2.5.3.2. Glutasyon Peroksidaz..... | 18 |
| 2.6. Periodontal Hastalıkta Reaktif Oksijen Türleri ve Antioksidanlar..... | 20 |
| 2.6.1. Malondialdehit ve Periodontal Hastalık | 22 |
| 2.6.2. Süperoksit Dismütaz ve Periodontal Hastalık..... | 22 |
| 2.6.3. Glutasyon Peroksidaz ve Periodontal Hastalık | 23 |
| 2.7. Hidroksitirozol | 24 |
| 2.7.1. Hidroksitirozol'un Emilimi ve Biyoyararlanımı..... | 25 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.7.2. Hidroksitirozol ve Toksikite..... | 25 |
| 2.7.3. Hidroksitirozol ve Etki Mekanizması | 26 |
| 2.7.4. Hidroksitirozol ve Enflamatuvar Hastalıklar | 26 |
| 2.7.5. Hidroksitirozol ve Periodontal Hastalık..... | 28 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM..... | 31 |
| 3.1. Deneysel Hayvanları ve Bakım Koşulları | 31 |
| 3.2. Çalışma Gruplarının Belirlenmesi | 31 |
| 3.3. Deneysel Periodontitis Oluşturulması ve Çalışma Protokolü..... | 32 |
| 3.4. Biyokimyasal Değerlendirme | 35 |
| 3.4.1. Serum ve Dişeti Örneklemeleri..... | 35 |
| 3.4.1.1. Serum Örneklerinin Elde Edilmesi | 35 |
| 3.4.1.2. Dişeti Dokusunun Elde Edilmesi ve Homojenizasyonu | 35 |
| 3.4.2. Serum ve Dişeti Örneklerinin Laboratuvar Analizleri..... | 36 |
| 3.5. Histolojik Değerlendirme | 36 |
| 3.5.1. Histopatolojik Değerlendirme..... | 37 |
| 3.5.2. Histomorfometrik Değerlendirme..... | 37 |
| 3.5.2. İmmünohistokimyasal Değerlendirme..... | 38 |
| 3.6. İstatistiksel Analiz..... | 39 |
| 4. BULGULAR..... | 40 |
| 4.1. Biyokimyasal Parametrelerin Değerlendirilmesi..... | 40 |
| 4.1.1. Oksidatif Stres Parametrelerinin Değerlendirilmesi | 40 |
| 4.1.1.1. Serum MDA, SOD, GSH-Px Ölçümlerinin Değerlendirilmesi..... | 40 |
| 4.1.1.2. Doku MDA, SOD, GSH-Px Ölçümlerinin Değerlendirilmesi | 41 |
| 4.1.2. Toksikite Değerlendirmesi | 43 |
| 4.3. Histolojik Parametrelerin Değerlendirilmesi | 45 |
| 4.3.1. Histopatolojik Değerlendirme..... | 45 |
| 4.3.2. Histomorfometrik Değerlendirme..... | 46 |
| 4.3.3. İmmünohistokimyasal Değerlendirme..... | 48 |
| 4.3.3.1. RANKL, OPG ve RANKL/OPG Ölçümlerinin Değerlendirilmesi..... | 48 |
| 5. TARTIŞMA | 53 |
| 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER | 63 |
| 7. KAYNAKLAR | 65 |

| | |
|--------------------------------------------------------------|-----------|
| 8. EKLER | 78 |
| EK 1: Deney Hayvanları Etik Kurul Onay Belgesi. | 78 |
| 9. ÖZGEÇMİŞ | 79 |



TABLÖLAR

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 1. Antioksidanların Sınıflandırılması..... | 16 |
| Tablo 2. Çalışma gruplarındaki serum MDA (nmol/ml), SOD (U/ml) ve GSH-Px (nmol/min/ml) seviyeleri..... | 41 |
| Tablo 3. Çalışma gruplarındaki doku MDA (nmol/ml), SOD (U/ml) ve GSH-Px (nmol/min/ml) seviyeleri..... | 42 |
| Tablo 4. Çalışma gruplarındaki serum AST (U/L), ALT (U/L), ALP (U/L), UREA (mg/dL) ve CREA (mg/dL) seviyeleri. | 44 |
| Tablo 5. Çalışma gruplarındaki Kemik Kaybı Değerleri (µm)..... | 47 |
| Tablo 6. Çalışma gruplarındaki RANKL, OPG, RANKL/OPG boyanma alanı yüzdeleri ve boyanma yoğunluğu ölçümleri. | 49 |

ŞEKİLLER

| | |
|--------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1. Periodontal hastalığın oluşumu. | 5 |
| Şekil 2. Periodontal hastalığın ilerleyişi. | 7 |
| Şekil 3. RANK-RANKL-OPG etkileşimin şematik gösterimi. | 9 |
| Şekil 4. Deney Hayvanlarının Randomizasyonu. | 32 |
| Şekil 5. Deney Aşamaları. | 34 |



FOTOĞRAFLAR

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Fotoğraf 1. Deneysel periodontitis modeli. | 32 |
| Fotoğraf 2. Hidroksitirozol. | 33 |
| Fotoğraf 3. HT/SF hazır formları..... | 33 |
| Fotoğraf 4. Alveolar kemik kaybının ölçümleri, H&E boyama, 40X büyütme, bar: 500 µm. | 38 |
| Fotoğraf 5. Histopatolojik kesitler (H&E boyama, 200X büyütme, bar: 100 µm). ... | 46 |
| Fotoğraf 6. Gruplara göre alveolar kemik kayıpları, H&E boyama, 40X büyütme, bar: 500 µm..... | 48 |
| Fotoğraf 7. Gruplara göre RANKL immün boyamasına ait histolojik kesitler. 200X büyütme, bar: 100 µm..... | 51 |
| Fotoğraf 8. Gruplara göre OPG immün boyamasına ait histolojik kesitler. 200X büyütme, bar: 100 µm..... | 52 |

FIGÜRLER

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figür 1. Çalışma gruplarındaki serum MDA (nmol/ml), SOD (U/ml) ve GSH-Px (nmol/min/ml) seviyeleri | 41 |
| Figür 2. Doku MDA (nmol/ml), SOD (U/ml) ve GSH-Px (nmol/min/ml) ölçümlerinin gruplara göre değişimleri..... | 43 |
| Figür 3. Serum GGT (U/L), AST (U/L), ALT (U/L), ALP (U/L), UREA (mg/dL) ve CREA (mg/dL) ölçümlerinin gruplara göre değişimleri..... | 45 |
| Figür 4. Kemik Kaybı ölçümlerinin gruplara göre değişimleri. | 47 |
| Figür 5. RANKL, OPG ve RANKL/OPG boyanma alanı yüzdelerinin gruplara göre değişimleri..... | 50 |
| Figür 6. RANKL, OPG ve RANKL/OPG boyanma yoğunluğu ölçümlerinin gruplara göre değişimleri. | 50 |

SİMGELER VE KISALTMALAR

| | |
|-----------------------|--------------------------------------------------|
| AİBÜ | : Abant İzzet Baysal Üniversitesi |
| AKK | : Alveolar Kemik Kaybı |
| ALP | : Alkalen Fosfataz |
| ALT | : Alanin Aminotransferaz |
| AP-1 | : Aktivatör Protein-1 |
| AST | : Aspartat Transaminaz |
| ATP | : Adenozin Trifosfat |
| bFGF | : basic Fibroblast Growth Factor |
| BMP | : Bone Morphogenetic Protein |
| cAMP | : Cyclic Adenosine Monophosphate |
| CAT | : Katalaz |
| Cl⁻ | : Klor |
| CREA | : Kreatin |
| DEHAM | : Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi |
| DICOM | : Digital Imaging and Communication in Medicine |
| dl | : Desilitre |
| DNA | : Deoksiribonükleik Asit |
| DOS | : Dişeti oluğu sıvısı |
| DS | : Distile Su |
| EC | : Ekstraselüler |
| EDTA | : Etilendiamin Tetraasetik Asit |
| ELISA | : Enzim-Linked Immunosorbant Assay |
| Fe | : Demir |
| GGT | : Glutamil Transferaz |
| gr | : Gram |
| GSH | : İndirgenmiş Glutasyon |
| GSH-Px | : Glutasyon Peroksidaz |
| GSH-Red | : Glutasyon Redüktaz |
| GSH-Tr | : Glutasyon Transferaz |

| | |
|-----------------------------------|------------------------------------------|
| GSSG | : Okside Glutasyon |
| H⁺ | : Hidrojen |
| H₂O | : Dihidrojen Monoksit |
| H₂O₂ | : Hidrojen Peroksit |
| HT | : Hidroksitirosol |
| ICAM | : İnterselüler Adezyon Molekülü |
| IL-11 | : İnterlokın-11 |
| IL-12 | : İnterlökın-12 |
| IL-1α | : İnterlökın-1 α |
| IL-1β | : İnterlökın-1 β |
| IL-6 | : İnterlökın-6 |
| Kg | : Kilogram |
| LFA | : Lymphocyte Function Associated Antigen |
| LOO[•] | : Lipit Peroksil Radikali |
| LOOH | : Lipit Hidroperoksit |
| LPS | : Lipopolisakkarit |
| Maks | : Maksimum |
| MDA | : Malondialdehit |
| Min | : Mininum |
| ml | : Mililitre |
| mm | : Milimetre |
| MSS | : Mine-Sement Sınırı |
| NADPH | : Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat |
| NF-κB | : Nükleer Faktör Kappa B |
| nmol | : Nanomol |
| NO | : Nitrik Oksit |
| O₂ | : Oksijen Molekülü |
| O₂^{•-} | : Süperoksit Serbest Radikal Anyonu |
| OH[•] | : Hidroksil Serbest Radikali |
| OH⁻ | : Hidroksil İyonu |
| OPG | : Osteoprotegerin |

| | |
|--------------------------------|---------------------------------------------|
| p | : Anlamlılık Değeri |
| PAMPs | : Pathogen-Associated Molecular Patterns |
| PBS | : Phosphate Buffered Saline |
| Pg | : Pikogram |
| PGE2 | : Prostaglandin E2 |
| PH | : Power of Hydrogen |
| PKA | : Protein Kinase A |
| PMN | : Polimorfonükleer |
| PRR | : Pattern Recognition Receptor |
| PTH | : Paratiroid Hormon |
| PUFA | : Polyunsaturated Fatty Acid |
| RANK | : Reseptör aktivatör nükleer kappa B |
| RANKL | : Reseptör aktivatör nükleer kappa B Ligand |
| RNS | : Reaktif Nitrojen Türleri |
| ROT | : Reaktif Oksijen Türleri |
| SF | : Serum Fizyolojik |
| SOD | : Superoksit Dismutaz |
| Ss | : Standart Sapma |
| TBAR | : Tiyobarbitürik Asit Reaktif Madde |
| TGF | : Transforming Growth Factor |
| Th1 | : T helper 1 |
| Th2 | : T helper 2 |
| TIMPs | : Tissue Inhibitors of Metalloproteinases |
| TLR | : Toll-Like Reseptör |
| TNF | : Tümör Nekroz Faktör |
| TNF-α | : Tümör Nekrozis Faktör-alfa |
| TRAP | : Tartrate-Resistant Acid Phosphatase |
| U | : Ünit |
| UREA | : Kan Üre Azotu |
| VEGF | : Vascular Endothelial Growth Factor |

1. GİRİŞ

Günümüzde diş kaybının en önemli nedeni olarak kabul edilen periodontal hastalık, diş yüzeyine tutunan biyofilm ile konak savunma mekanizması arasındaki dengenin bozulması ile karakterize periodonsiyumun enflamatuvar bir hastalığıdır (1). Sağlıklı periodonsiyum periodontal hastalığın gelişmesi ile klinik özelliklerini kaybeder ve periodontal cep, sondlamada kanama, dişeti çekilmesi ve ataşman kaybı gibi bulgular görülmeye başlar. Bu durumun devam etmesi ile dişlerde migrasyon, mobilite ve diş kayıpları görülebilmektedir (2). Biyofilm formunda bulunan plak mikroorganizmalarının, periodontal hastalığın en önemli etkeni olduğu kabul edilmiştir (3). Biyofilmin olgunlaşmasıyla beraber bakteriler, yüzey ilişkili yapıları vasıtasıyla birbirleri ile ve farklı türler arasında etkileşim kurmaya başlar. Biyofilm, bakterilerin besinleri işlemesini ve almasını kolaylaştırır. Aynı zamanda bakterileri diğer türlerden, konağın savunma mekanizmasından koruyarak daha kararlı bir topluluk kurulmasına izin verir (4,5). Dental plak, temizlenmiş dişlerin yüzeyinde 2-4 gün içinde oluşur. İki gün içinde özellikle lipopolisakkarit'ler olmak üzere bakteriye has hastalık yapıcı özellik olan virülans faktörleri, epitel hücrelerinin yüzey reseptörleri ile etkileşime girer. Konağın çeşitli lokal fizyolojik savunma mekanizmaları doku bütünlüğünün korunmasında rol oynar. Bakteri ve ürünlerinin, tükürük ve dişeti oluğu sıvısı ile devamlı yıkanması, birleşim epiteli ve dişeti epitelinin sürekli olarak yenilenme "turn-over" özelliği ile bakterilerin tutunmasını engellemesi bu mekanizmalara örnek olarak verilebilir (6,7). Bu aşamalarda mikroorganizmalar mekanik temizliğin yanı sıra konağın oldukça güçlü antimikrobiyal savunma sistemleri ile algılanıp imha edilmeye başlar. Bu antimikrobiyal savunma sistemlerinden olan patern tanıma reseptörleri (PRR)'nin patojen ile ilişkili moleküler yapıları (PAMP)'leri tanıması ile periodontal dokularda, reaktif oksijen türleri (ROT), reaktif nitrojen türleri (RNT), çeşitli sitokin (interlökin-1, interlökin-12 ve tümör nekroz faktörü- α) ve kemokin (Interlökin-8, monosit kemoatraktan protein-1) sentezi ve Nuclear Factor kappa B "NF- κ B"nin aktivasyonu gerçekleşir (8). Bu süreçte matriks metalloproteinaz gibi kollajen yıkıcı enzimler de

artarak bağ dokusunda önemli derecede yıkım gerçekleşir ancak henüz alveoler kemik kaybı görülmez. İlerleyen süreçte alveoler kemik kaybı görülmeye başlar (9).

Günümüzde kemik yıkımı tümör nekroz faktör (TNF) reseptör ailesinin üç üyesini içeren mekanizma ile tarif edilmektedir. Bu üç üye; NF-κB'nin reseptör aktivatörü (RANK), NF-κB ligandı reseptör etkinleştiricisi (RANKL) ve Osteoprotegerindir (OPG) (10). RANK-RANKL-OPG etkileşimi periodontitisle ilişkili alveoler kemik kaybında kritik bir rol oynamaktadır. RANKL, Osteoklast prekürsör hücrelerinin yüzeylerinde bulunan RANK reseptörüne bağlanarak, osteoklastların aktivasyonunu ve olgunlaşmasını sağlar (11). Mezenkimal hücreler tarafından sentezlenen OPG ise RANKL'ın RANK reseptörüne bağlanmasını engelleyen tuzak bir molekül olarak rol oynar. Osteoklastların farklılaşmasını ve aktivasyonunu bloke ederek osteoklastogenezisi engeller. RANKL, kemik rezorpsiyonunun güçlü bir uyarıcısı iken, OPG koruyucu bir molekül olarak görev yapar (10,12).

Canlıların biyolojik sisteminde en önemli serbest radikaller, oksijen vasıtasıyla oluşan radikallerdir. Serbest radikal, dengesiz, kısa ömürlü ve oldukça reaktiftir. Tek sayıda elektron içerdiğinden dolayı stabilite elde etmek ister ve gerekli elektronu yakalamaya çalışarak diğer bileşiklerle çabucak reaksiyon gösterir. Serbest radikal, en yakındaki kararlı moleküle saldırır ve elektronunu çalar. Saldırıya uğrayan molekül elektronunu kaybettiğinde, canlı bir hücrenin parçalanmasına neden olabilecek bir zincir reaksiyon basamağını başlatan bir serbest radikal haline dönüşür. Oksijen (O_2), elektron alıcısı olarak görev yapar ve aerob canlıların yaşamı için esansiyel bir maddedir. Memeli hücrelerinde yaşamsal faaliyetler için gerekli olan ATP üretiminin büyük bir kısmı mitokondriyal elektron transport sisteminde gerçekleşir. ATP, O_2 'in dört elektronunun su (H_2O) oluşturmak üzere indirgenmesiyle elde edilir. Fakat bu süreçte O_2 'in %1-3'ü tam olarak suya dönüşemez ve ara ürün olarak serbest oksijen radikalleri ve bunların da çeşitli reaksiyonları sonucu reaktif oksijen türleri (ROT) meydana gelir (13).

Normal fizyolojik metabolizmada vücutta sürekli olarak oluşan bu serbest radikallere ve zararlı etkilerine karşı koruyucu antioksidan mekanizmaları

bulunmaktadır. Bu antioksidan mekanizmalar ise antioksidan enzimler (süperoksid dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon transferaz (GSH-Tr), glutatyon redüktaz (GSH-Red) enzimleri, vitaminler (A, E ve C vitamini) ve organik/inorganik moleküllerdir (Glutatyon, Selenyum, Melatonin). Normal fizyolojik şartlarda antioksidan sistem ile serbest radikaller arasında bir denge söz konusudur ve bu denge ile serbest radikaller zararsız hale gelmektedir. Bu denge oksidan tarafına doğru bozulursa, oksidatif strese ve hasar veren olayların başlamasına sebep verir. Oksidatif stres genel olarak oksidan ve antioksidan mekanizmalar arasındaki dengenin bozulması olarak tanımlanır (14). Dengenin antioksidan tarafına kaydırılması yumuşak ve sert doku kayıplarını azaltacak ve vücuda verilen zararı en askari seviyede kalmasına yardımcı olacaktır. Antioksidanların hücre sinyalizasyonunda önemli düzenleyiciler olduğu ve kemik yıkımının önlenmesinde etkin rol üstlendiği günümüzde bilinmektedir (14,15). Deneysel araştırmalarda proenflamatuvar sitokinlerin, antioksidan ve antiinflamatuvar ilaçlarla düzenlenerek doku yıkımının durdurulabileceği rapor edilmiştir (14,16).

Birçok laboratuvar ve klinik çalışmalarda yumuşak ve sert doku metabolizması üzerinde yeni yaklaşımlar geliştirilmek amacıyla antioksidanlar, bitki özütleri ve vitaminler kullanılmıştır. Literatüre bakıldığında Thymoquinone, Koenzim Q, Galik Asit, Mangiferin, Resveratrol, Verbascoside, Flavonoidler ve Melatonin gibi farklı antioksidanların periodontal doku yıkımı üzerine etkilerinin incelendiği çalışmalar bulunmaktadır (17-24).

Hidroksitirozol (HT) Akdeniz diyetinin zengin içeriğini oluşturan zeytin ve zeytinyağında bolca bulunan, reaktif oksijen türlerinin nötralize eden zincir kırıcı antioksidanlardan olan fenolik bir bileşiktir. Günümüzde, Akdeniz diyetinin insan sağlığına oldukça faydaları olduğu bilinmektedir. Akdeniz diyeti, ana yağ kaynağının zeytinyağı olduğu bitki besinlerinden kaynağını almaktadır. Geçmiş çalışmalara bakıldığında zeytinyağından zengin akdeniz diyetinin tüketimi ile kanser oranlarının, mortalitenin azaldığı ve yaşam ömrünün uzadığı bildirilmiştir. HT'nin kardiyovasküler sağlığı teşvik ettiği (25), DNA hasarını ve tümör hücre proliferasyonunu engellediği (26), oksidatif stresin artırdığı endotelial disfonksiyon riskini azalttığı (27), anti-

enflamatuar ve anti-viral özellikleri ile HIV enfeksiyonu önlediği/azalttığı gösterilmiştir (28).

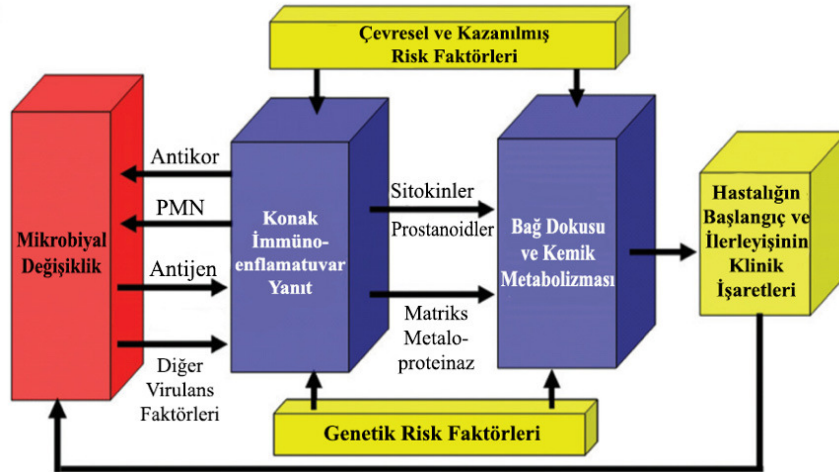
Tüm bu bilgiler ışığında HT'nin periodontal hastalıkta dental plağın indüklediği enflamasyonu azaltabileceği ve alveolar kemik kaybını engelleyebileceği varsayılmaktadır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Periodontal Hastalık

Periodontal hastalık, diş yüzeyine tutunan biyofilm ve konak savunma mekanizması arasındaki dengenin bozulması ile karakterize periodonsiyumun enflamatuvar bir hastalığıdır. Günümüzde diş kaybının en önemli nedeni olarak kabul edilmektedir (1). Periodontitis, dünya nüfusunun ortalama %11.2 oranında görülmektedir ve en çok görülen kronik durumlar içinde 6. sıraya yerleşmiştir (2). Sağlıklı periodonsiyum periodontal hastalığın gelişmesi ile klinik özelliklerini kaybeder ve periodontal cep, sondlamada kanama, dişeti çekilmesi ve ataşman kaybı gibi bulgular görülmeye başlar. Bu durumun devam etmesi ile dişlerde migrasyon, mobilite ve diş kayıpları görülebilmektedir (29). Periodontitis genetik, çevresel ve diğer kazanılmış risk faktörlerinden etkilenecek şekilde oluşan enflamatuvar hastalıktır (Şekil 1) (30).



Şekil 1. Periodontal hastalığın oluşumu (30).

2.2. Biyofilm ve Mikrobiyal Plak

Biyofilm formunda bulunan plak mikroorganizmalarının, periodontal hastalığın en önemli etkeni olduğu kabul edilmektedir. Mikrobiyal biyofilm, diş yüzeyi üzerinde gelişen, bakteri ve salya kökenli yapışkan bir matrikse yerleşmiş, kanallar ve porlar vasıtasıyla birbirleri ile iletişim halinde olan mikroorganizmaların oluşturduğu

topluluktur (3). Diş çürüğü ve periodontal hastalıkların temel etiyolojik ajanı olan mikrobiyal biyofilm, içeriğinde bulunan mikroorganizmalar arasındaki sinerjik etkileşim sonucunda daha organize yapılara dönüşür (1,8). Olgun diş biyofilmleri yaklaşık 700 çeşitli bakteri türüne ev sahipliği yapmaktadır (31). Ağız içi bakterilerin kolonizasyonu dokunun türüne, kolonize olduğu bölgeye ve maruz kaldığı dış kuvvetlere bağlı olarak değişebilmektedir. Dişeti sulkusu ve komşu dişeti papilla arası “interdental col” bölgesi bakterilerin rahat bir şekilde çoğalabileceği alanlardır. Biyofilm ilk olarak öncü organizmalar ile oluşmakta ve bu ilk kolonize olan türleri, biyofilmin yapısını değiştirecek diğer türler izlemektedir. Ağız florasının bir parçası olan bu ilk kolonize bakteri türlerine örnek olarak *Streptococcus*, *Veillonella*, *Prevotella*, *Neisseria* ve *Actinomyces* verilebilir (32,33). Biyofilmin olgunlaşmasıyla beraber bakteriler, yüzey ilişkili yapıları vasıtasıyla birbirleri ile ve farklı türler arasında etkileşim kurmaya başlar. Biyofilm, bakterilerin besinleri işlemesini ve almasını kolaylaştırır. Aynı zamanda bakterileri diğer türlerden, konağın savunma mekanizmasından koruyarak daha kararlı bir topluluk kurulmasına izin verir (4,5).

2.3. Antimikrobiyal Savunma

Biyofilm formundaki plak, diş ve epitel yüzeyleri ile sürekli etkileşim halindedir. Dental plak, temizlenmiş dişlerin yüzeyinde 2-4 gün içinde oluşur. Supragingival birikimi subgingival plak birikimi takip eder. İki gün içinde özellikle lipopolisakaritler olmak üzere bakteriye has hastalık yapıcı özellik olan virülans faktörleri, epitel hücrelerinin yüzey reseptörleri ile etkileşime girer. Bakteriler diş biyofilminden sürekli olarak yayılır ve çoğunlukla herhangi bir konak yanıtı ortaya çıkmadan yok edilir. Sağlıklı periodontal dokulara sahip kişilerde önemli bir bakteri saldırısı ve doku yıkımı gözlenmemektedir. Konağın çeşitli lokal fizyolojik savunma mekanizmaları doku bütünlüğünün korunmasında rol oynar. Bakteri ve ürünlerinin tükürük ve dişeti oluğu sıvısı ile devamlı yıkanması, birleşim epiteli ve dişeti epitelinin sürekli olarak yenilenme “turn-over” özelliği ile bakterilerin tutunmasını engellemesi bu mekanizmalara örnek olarak verilebilir (6,7). Vasküler geçirgenliğin ve eksuda formunda dişeti oluğu sıvısı (DOS) artışı, lökositlerin migrasyonu görüldüğü bu süreç “Başlangıç lezyonu” adı verilir. Epitel altı bağ dokusuna enflamatuvar tablo etkilenimi

%5-10 arasındadır. Devamında bakteri ve ürünleri dişeti bağ dokusuna doğru ilerleyebilir (9).

Plak birikiminin başlamasından 4-7 gün sonra “erken lezyon” süreci başlar. Birleşim epiteli ve dişeti oluşunda lökosit sayısı artar ve bölgeye komşu bağ dokusunda lenfosit birikimi olur. Birleşim epiteli altında bağ dokusu bölgesinde fibroblastlarda değişim görülür ve perivasküler kollajen yıkımı artar. Klinik olarak ödem ve eritem görülür. Enflamasyondan etkilenmiş dişeti bağ dokusu alanı yaklaşık olarak %15’dir. Bu alandaki bağ dokusunda kollajen hasarı %70’lere kadar ulaşır (9). Plak birikimini takiben 14-21 gün sonra erken lezyon “yerleşmiş lezyon” haline dönüşür. Bu aşamalarda mikroorganizmalar mekanik temizliğin yanı sıra konağın oldukça güçlü antimikrobiyal savunma sistemleri ile algılanıp imha edilmeye başlar. Bu sistemlere örnek olarak tükürükte bulunan peptitler (histatinler, katelisinler vs.), epitel hücreleri, nötrofiller (34) ve patern tanıma reseptörleri “pattern recognition receptor” (PRR) verilebilir (7). Patern tanıma reseptörleri mikroorganizmalar üzerinde bulunan patojen ile ilişkili moleküler yapıları “pathogen-associated molecular pattern” (PAMP) tanımaktadır. Patern tanıma reseptörlerinin PAMP’leri tanınması ile periodontal dokularda reaktif oksijen türleri (ROT), reaktif nitrojen türleri (RNS) , çeşitli sitokin (interlökin-1, interlökin-12 ve tümör nekroz faktörü- α) ve kemokin (Interlökin-8, monosit kemoatraktan protein-1, vb.) sentezi ve “Nuclear Factor kappa B” (NF- κ B)’nin aktivasyonu gerçekleşir (8). Bu süreçte matris metalloproteinaz gibi kollajen yıkıcı enzimler de artarak bağ dokusunda önemli derecede yıkım gerçekleşir ancak henüz alveoler kemik kaybı görülmez. Birleşim epitelinin cep epiteline dönüşmeye başladığı ve “ilerlemiş lezyon” olarak adlandırılan bu durumda ise alveoler kemik kaybı görülür (9) (Şekil 2).



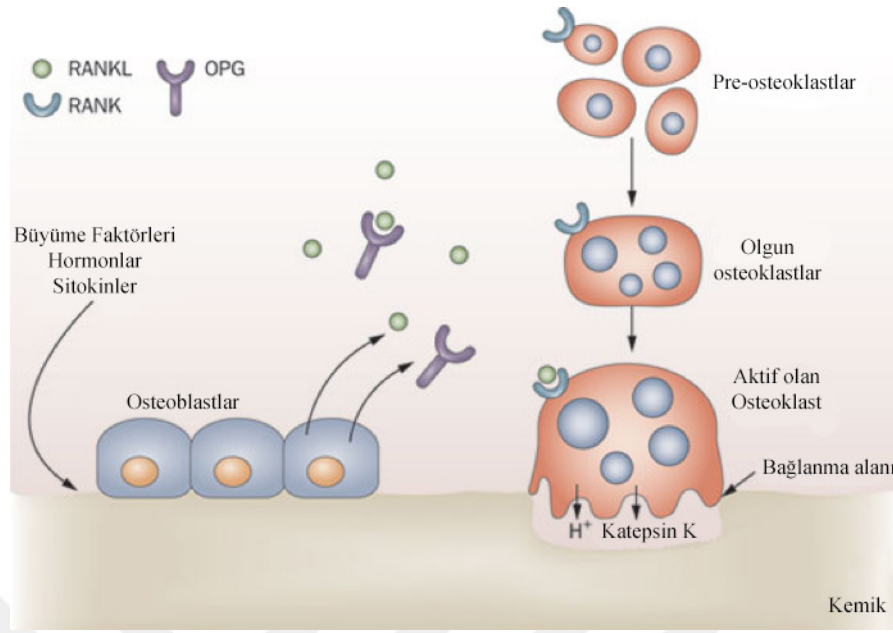
Şekil 2. Periodontal hastalığın ilerleyişi (MCS).

2.4. Alveolar Kemik Yıkımı

Dişlerin desteği olan alveoler kemiğin kaybı, periodontal hastalıkta oldukça önemlidir ve periodontal hastalığın belirleyici bir özelliğidir. Bu yüzden periodontitisin tedavisi için alveol kemik yıkım mekanizmasının anlaşılması gerekmektedir.

Birçok enflamatuvar yolak kemik yıkımına neden olabilmektedir (11). Makrofajlar, spesifik bağışıklığı harekete geçirilmesi için antijenleri işleme ve sunmaya ek olarak, kemik rezorpsiyonunu indükleyen sitokinleri ve enzimleri de üretir. Günümüzde ise kemik yıkımı tümör nekroz faktör (TNF) reseptör ailesinin üç üyesini içeren mekanizma ile tarif edilmektedir. Bu üç üye; “receptor activator of NF- κ B” NF- κ B'nin reseptör aktivatörü (RANK), “RANK ligand” RANK ligandı (RANKL) ve Osteoprotegerindir (OPG) (10). RANKL, normal kemik metabolizmasında osteoblastlar tarafından üretilir iken enflamatuvar süreçte T lenfositleri içeren immün sistem hücreleri tarafından da üretilmektedir. Buna ilave olarak RANKL ekspresyonu paratiroid hormonu, D3 vitamini ve interlökin-11 gibi diğer kemik metabolizma modülatörleri tarafından da düzenlenir (10). RANKL'ın preosteoklast hücreleri yüzeyinde bulunan RANK reseptörü ile bağlanması sonucu, N-terminal kinaz aktive olur. Devamında NF- κ B'nin aktive olması ile osteoklastların farklılaşması gerçekleşir. Osteoklastların farklılaşması ile kemik yıkımı süreci başlamaktadır (11).

Osteoprotegerin ise mezenkimal hücreler tarafından sentezlenmektedir. Çözünebilir bir TNF reseptör ailesine ait bir protein olan OPG, RANKL'ın RANK reseptörüne bağlanmasını engelleyen tuzak bir molekül olarak rol oynar. Osteoklastların farklılaşmasını ve aktivasyonunu bloke ederek osteoklastogenezisi engeller (**Şekil 3**) (11). RANKL, kemik rezorpsiyonunun güçlü bir uyarıcısı iken, OPG koruyucu bir molekül olarak görev yapar. Kemik yapım-yıkım dengesinde RANK-RANKL-OPG etkileşimi önemli olmaktadır. Periodontal hastalıklarda, RANKL ve OPG düzeylerinin belirlenmesi kemik rezorpsiyonunun değerlendirilmesinde ve hastalıkların teşhisinde belirteç olarak rol oynar (8,10).



Şekil 3. RANK-RANKL-OPG etkileşiminin şematik gösterimi (11).

2.5. Reaktif Oksijen Türleri ve Antioksidanlar

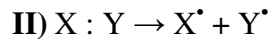
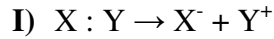
Reaktif oksijen türleri ilk olarak ondokuzuncu yüzyılda Gomberg tarafından organik serbest radikalleri teorisi ile ortaya atıldı. Serbest radikalın canlı sisteminde olabileceği teorisi gelişti. Gerschman ve arkadaşları (1954), oksijenin zararlı etkilerinin serbest oksijen radikallerinden kaynaklı olduğu ilk kez bildirdi. Harman 1956 yılında yaşlanmaya serbest radikallerin etki ettiğini söyledi. Yaşlanma teorisinden 13 yıl sonra, 1969 yılında McCord ve Fridovich önemli bir serbest radikal olan süperoksit anyonuna karşı ilk savunma enzimi olan süperoksit dismutazı tanıttı ve böylece yeni bir araştırma alanını başlattı. Britton 1978 yılında hücrel olarak yapılan mitokondriyal solunumun, reaktif oksijen türlerinin üretmesindeki rolünü belirtti. Halliwell ve Gutteridge, 1989 yılında, reaktif oksijen türlerinin hem serbest radikalleri hem de radikal olmayan oksijen türevlerini içerdiğini bildirmiş, ilave olarak antioksidanları ilk kez tanımlamışlardır. Sen, 1995 yılında oksidatif stresi tanımlamış ve birçok araştırmacı çeşitli patofizyolojik duruma etki eden serbest radikalleri ve reaktif oksijen türlerinin rolünü belirleyip kaydetmişlerdir (35).

2.5.1. Reaktif Oksijen Türleri

Bir kimyasal tür olarak kabul edilen serbest radikaller, yörüngesindeki bir veya daha fazla eşleşmemiş (ortaklanmamış) elektrona sahip, bağımsız olarak var olabilen bir atom veya molekül olarak tanımlanabilir. Serbest radikal dengesiz, kısa ömürlü ve oldukça reaktiftir. Tek sayıda elektron içerdiğinden dolayı stabil hale gelmek ister ve gerekli elektronu yakalamaya çalışarak diğer bileşiklerle çabucak reaksiyon gösterir. Genellikle serbest radikal en yakındaki kararlı moleküle saldırır ve elektronunu çalar. Saldırıya uğrayan molekül elektronunu kaybettiğinde, canlı bir hücrenin parçalanmasına neden olabilecek bir zincir reaksiyon basamağını başlatan bir serbest radikal haline dönüşür. Serbest radikaller pozitif yüklü (kasyon), negatif yüklü (anyon) veya elektriksel olarak nötral olabilirler (35).

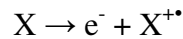
Serbest radikaller oluşumunu şu şekilde özetleyebiliriz:

A. Normal molekül veya atomlarda elektron paylaşıldığında kovalent bağın bölünmesi ile: Kovalent bağ taşıyan normal bir molekülün homolitik kırılma “homolytic cleavage” sonrası her bir parçada ortak elektronlardan biri kalır (I) veya iki parçada da eşleşmemiş elektronlara sahip olurlar (II).

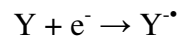


B. Biyolojik sistemde serbest radikallerin üretilmesinde önemli bir kaynak olan “elektron transferi” ile:

I) Oksidasyon reaksiyonu: Normal bir moleküldeki tek bir elektron kaybıyla



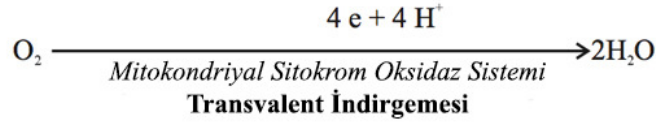
II) İndirgeme reaksiyonu: Normal bir moleküle tek bir elektron ilavesi ile oluşmaktadır.



Biyolojik sistemdeki en önemli serbest radikaller oksijenin radikal türevleridir. Enerjiyi serbestleştirmek ve ksenobiyotikleri detoksifiye etmek için çeşitli maddelerin aktarımında (transferinde) oksijen gereklidir. Bu işlemler sırasında oksijen, terminal elektron alıcısı olarak görev yapar ve nihayetinde daha kararlı bileşik olan suya

dönüşür. Solunum zincirinin sitokrom oksidaz sistemi vasıtasıyla bir O₂ molekülünün indirgenmesi için 4 elektron gerekir. Bu durum oksijenin suya transvalent indirgenmesi olarak bilinir. Ancak, birçok reaksiyon bu indirgenmelerin tek bir elektrona ihtiyacı olan bir dizi tamamlanmamış univalent indirgenme şeklinde gerçekleşmesine izin verir. Bu tip indirgemeler sonucu Reaktif Oksijen Türleri (ROT) olarak bilinen bir dizi reaktif radikal ve radikal olmayan ürünlerin ortaya çıkmasına neden olur (35). Solunum zincirinin bir O₂ molekülünü indirgemesi aşamaları aşağıdaki formüllerle gösterilmiştir:

- 1) $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet -}$ (Süperoksit Serbest Radikal Anyonu)
- 2) $2 O_2^{\bullet -} \rightarrow H_2O_2$ (Hidrojen Peroksit) + O₂
- 3) $H_2O_2 + H^+ + e^- \rightarrow OH^{\bullet}$ (Hidroksil Serbest Radikali) + H₂O
- 4) $OH^{\bullet} + H^+ + e^- \rightarrow H_2O$



Reaktif oksijen türleri endojen ve ekzojen kaynaklıdır. Ekzojen kaynaklar; ısı, travma, ultrason, ultraviyole ışını, ozon, sigara, egzoz dumanı, radyasyon, enfeksiyon, aşırı egzersiz ve terapötik ilaçlardır. Endojen kaynakları ise; mitokondrial elektron taşıma sistemlerinden, konakçı savunma hücreleri (fagositler) ve bağ dokusu hücrelerinin (osteoklastlar ve fibroblastlar) fonksiyonları sonucu oluşan ürünleridir.

2.5.2. Oksidatif Stres ve Doku Hasarı

Periodontal doku yıkımı, mikroorganizmalar ve bu mikroorganizmaların ürettiği ürünler ile konak yanıtı arasındaki dengenin bozulmasından kaynaklanmaktadır. Periodontal yıkımda proteolitik enzimler (örn. nötrofil elastaz) ve inhibitörleri (örn. α₁-anti-tripsin) ve aynı zamanda reaktif oksijen türleri (ROT) ile antioksidan sistem arasındaki homeostatik dengenin bozulması önemli rol oynamaktadır (14).

Normal fizyolojik süreçte ROT aktivitesi ile antioksidan savunma kapasitesi arasında dinamik bir denge vardır. Bu denge antioksidan savunmasında bir azalma ya da ROT üretiminde bir artış ile ROT lehine değişebilir ve dokulara zarar veren oksidatif stres oluşur. Hücre başına insan vücudunda günde 1 milyar ile 3 milyar arasında reaktif

tür üretildiği tahmin edilmektedir. Bu durum antioksidan savunma sistemlerinin insan sağlığına olan önemini de ortaya koymaktadır (14,36).

Oksidatif stresin hücre düzeyindeki etkileri hücre adaptasyonu, hücre hasarı ve hücre ölümü ile açıklanmaktadır:

Hücre adaptasyonu, savunma sistemlerinin düzenlenmesiyle hücre uyumunu sağlar. Uyum sonrası hücre hasara karşı tamamen korunabilir, hücre bir ölçüde hasara karşı koyabilir ancak tamamen korunamaz veya hücre aşırı miktarda korunur, böylece yüksek seviyedeki oksidatif strese karşı daha dirençli bir yapı izlenir. Hücre hasarında hücrenin lipid, DNA, protein ve karbonhidrat vb. yapıları oksidatif hasardan etkilenir. Oksidatif hasar adaptasyon sırasında da oluşabilir. Ancak hasarın tamamı oksidatif strese bağlı değildir. Bu durum oksidatif stresle ilişkili iyon seviyelerinin artışı (örn. Ca^{+2}) veya proteazların aktivasyonundan kaynaklanabilir. Oksidatif hasar gören hücre yapıları tamir edilerek veya hasar gören moleküller değiştirilerek iyileştirilebilir. Hücreler kalıcı oksidatif hasarla idame edilebilir veya hücrede DNA gibi önemli yapılar hasar görmüşse hücrede apoptozis veya nekroz ile hücre ölümü gerçekleşebilir (37).

Radikaller savunma mekanizmalarının kapasitesini aşarlarsa hücrelerin protein, DNA ve lipit gibi önemli bileşenlerinde hasara neden olurlar.

2.5.2.1. Protein Hasarı

Reaktif oksijen türleri ile protein hasarının biyolojisi son derece karmaşıktır ve çok iyi anlaşılamamıştır. Dean ve ark. (38) yaptıkları çalışmalarda bazı oksitlenmiş proteinlerin hücreler tarafından kötü bir şekilde işlendiğini, bu nedenle yaşlanmada ve diyabet gibi kronik koşullarda biriktiklerini bildirmişlerdir. Bu tür birikimlerin etkileri, tersinir veya geri döndürülemez işlevsel inaktivasyona ve proteazlara olan duyarlılığın artmasına neden olabilir (39).

Radikal saldırısı proteinlerin C=C bağlarını etkileyerek karbon merkezli radikal intermediyatları oluşturur. Bu ürünler proteinlerle etkileşime girerek yapılarında

katlanmalar meydana getirip protein yapı ve fonksiyonunu bozarlar. Reaktif oksijen türlerinin proteinlere olan etkisi (38) aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir:

- Proteinlerde geri dönüşümlü / geri dönüşümsüz katlanma veya açılmalar,
- Protein parçalanması ve polimerizasyon reaksiyonu,
- Modifiye proteinlerin proteinazlar tarafından yıkılması,
- Protein bağlı radikal oluşumu veya protein bağlı ROT oluşumu,
- Karbonil bileşikler gibi stabil son ürünlerin oluşması görülebilir.

2.5.2.2. DNA Hasarı

Hidroksil ve peroksinitrit radikalleri DNA yapısında uç kırıklarına, baz çiftleri mutasyonlarına (pürin ve pirimidin mutasyonları) neden olmaktadır. Guaninin 8-hidroksiguanine çevrilmesi etki etmektedir. Ayrıca DNA içeriğinde kayıpların olmasına, yer değiştirmelere, yırtılmalara ve sekans amplifikasyonlarına sebep olarak zarar verebilmektedir (40).

2.5.2.3. Lipid Peroksidasyonu

Lipid peroksidasyonu, serbest radikal türlerinin en önemli reaksiyonlarından biridir. Hidroksil ve peroksinitrit radikalleri lipid peroksidasyonu gerçekleştirebilir. Halliwell (39) peroksidasyon reaksiyonunu başlangıç, yayılma ve yok etme olarak 3 ana başlık altında toplamıştır.

Hidroksil veya peroksinitrit lipid membranındaki yağ asidinin yan zincirine atak yaparak (başlangıç), bir hidrojeni uzaklaştırıp karbon merkezli (L^{\bullet}) bir radikal oluşturur. Bu radikal düzenlenerek konjuge dien veya başka bir yağ asidi yan zinciri radikali ile birleşerek kovalent bağ oluşturabilir. Sonuçta çapraz bağlar oluşarak membran yapı ve fonksiyonu bozulur. Fakat yan zincir radikali genellikle oksijenle birleşerek lipid peroksil radikalini (LOO^{\bullet}) oluşturur. Bu radikalde bir başka yağ asidi yan zincirine atak yaparak karbon merkezli radikal veya lipid hidroperoksit ($LOOH$) radikali oluşumuna (yayılma) neden olur. Bu şekilde yayılan reaksiyonla oluşan yüzlerce lipid hidroperoksit birikimi membran fonksiyonunu bozarak hücre yıkımına (yok etme) sebep olur.

Lipit peroksidasyonu ile konjuge dienler, lipit peroksitleri, aldehitler (örn: malondialdehit), acrolein, izoprostanlar (örn: araşidonik asitten F2-izoprostanlar), nöroprostanlar (örn: F4-izoprostanlar) ve kararsız hidrokarbonlar (örn: pentan, etan) oluşur (37).

Malondialdehid

Yağ asitlerinin oksidasyonu reaktif bir radikal tarafından yağ asitlerinin metilen gruplarından bir hidrojen atomunun koparılması ile başlamaktadır. Karbon merkezli radikal oluşması ve daha sonra moleküler oksijenin bağlanması ile lipit hidroperoksitleri meydana gelir. Lipit hidroperoksitleri, lipit peroksidasyonunun erken aşamasını oluşturur. Lipit hidroperoksitlerinin yıkımı ile biyoaktif aldehitler oluşur. Başlıca aldehidler ise malondialdehit (MDA) ve hidroksialkenaller (örn. 4-OH-nonenal)'dir. Bu bileşikler ya hücrelerde metabolize edilir, ya da diffüze olarak diğer hücrelerde hasar yaratır (41).

Malondialdehit uçucu formda, düşük molekül ağırlıklı, kısa zincirli 1,3-dikarbonil bileşiği olup orta derecede zayıf bir asittir ($pK_a = 4.46$) (42). Malondialdehit, malonaldehit olarak da adlandırılır ve yıllar boyunca lipid peroksidasyonunda dikkat odağı olmuştur. Çünkü tiobarbitürik asit (TBA) tayini için yaygın olarak serbest MDA ölçümü ile yapılmıştır. Malondialdehit'in canlılardaki potansiyel toksisitesi ve oluşturduğu immün cevap iyi bilinmektedir. Çoğunlukla bisiklik endoperoksitler vasıtasıyla linolenik, araşidonik ve dokosaheksaenoik asitler gibi 2 çift bağdan daha fazlasını içeren "polyunsaturated fatty acid", "çoklu doymamış yağ asitleri" (PUFA)'nın peroksidasyonu sonucu ortaya çıkar. Bazen de eikozanoid metabolizması sırasında enzimatik olarak oluşturulur (41,43).

Malondialdehit ayrıca DNA bazlarıyla reaksiyona girer ve mutajenik lezyonlara neden olabilir. Guanin (G), MDA tarafından tercih edilen bir hedefdir. Eğer *E. Coli* tarafından eksprese edilen MDA ile DNA, işleme tabi tutulursa, mutasyon sıklığında yaklaşık on kat artış gözlenir. Guanin – Timin (T) transversiyonu, Adenin (A) – G transisyonu ve Sitozin (C) – T transisyonu baskın olur ancak bazı frameshift "çerçeve

kayma mutasyonu” ve delesyonlar da meydana gelir. Bu tarz DNA’lar insan hücrelerinde mutajenik kabul edilir ve büyük insersiyon ve delesyonlara neden olur (41).

Aerobik bir ortam varlığında metabolizma reaksiyonları sırasında dış etkenlere bağlı olarak meydana gelen oksijen kaynaklı radikaller, lipoproteinlerde ve hücre zarında bulunan lipitlerde oksidasyona neden olmaktadır. Lipit hidroperoksitleri ile nihai yıkım ürünü olan düşük molekül ağırlıklı MDA, lipit peroksidasyonunun bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (41,44).

2.5.3. Antioksidanlar

Antioksidanlar ve serbest radikaller, yaşamın tamamına nüfuz etmekte ve redoks biyolojisi alanını oluşturmaktadır. Serbest radikaller ile antioksidanlar arasında bir denge mevcuttur. Antioksidanlar, serbest radikal seviyelerini düşük tutma görevini yapar ve çok fazla zarar vermeden faydalı biyolojik işlevlerin yerine getirilmesine izin verir (45).

Antioksidan, düşük konsantrasyonlarda okside edilebilir bir substrat ile karşılaştığında, bu substratın oksidasyonunun önemli ölçüde geciktirilmesi veya inhibe edilmesi şeklinde tanımlanabilir. Bu tanımdan da anlaşılacağı üzere, antioksidanların fizyolojik rolü, serbest radikal içeren kimyasal reaksiyonlar sonucu oluşabilecek hücresel bileşen hasarlarını önlemektir (46). Antioksidan sistem hasar öncesi radikal oluşumunu önler, oksidatif hasarı onarır, hasara uğramış molekülleri temizler ve mutasyonları önler. İnsan vücudunun antioksidan savunma sistemleri karmaşıktır ve çeşitli şekillerde sınıflandırılmaktadır. Son sınıflama; fonksiyonlarına, hücredeki yerlerine, korudukları yapıya, çözünübilirliğine ve kaynağına göre yapılmıştır (Tablo 1, 2) (14).

Tablo 1. Antioksidanların Sınıflandırılması.

| Fonksiyonuna Göre | |
|---------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| a) Süpürücü Antioksidanlar | Enzimler: Süperoksit dismutaz (1, 2 ve 3), katalaz, glutatyon peroksidaz, DNA tamir enzimleri. Metal iyonlarını ayıranlar: Albumin, laktoferrin, transferrin, seruloplazmin, hemopeksin, karotenoidler, glutatyon peroksidaz, ürik asit, polifenolik flavenoidler |
| b) Zincir Kırıcı Antioksidanlar | Askorbat (vitamin C), karotenoidler (retinol-vitamin A), urik asit, α -tokoferol (vitamin E), polifenoller (flavenoid), bilirubin, albümin, ubiquinon, indirgenmiş glutatyon peroksidaz |
| Hücre Lokalizasyonuna Göre | |
| a) Hücre İçi | Süperoksit dismutaz (1-2), katalaz, glutatyon peroksidaz, indirgenmiş glutatyon, ubiquinon (indirgenmiş form) |
| b) Hücre Dışı | Süperoksit dismutaz (3), selenyum-glutatyon peroksidaz, indirgenmiş glutatyon, laktoferrin, transferrin, seruloplazmin, albümin, askorbat, karotenoidler, ürik asit, |
| c) Membranla ilişkili | α -tokoferol |
| Korundukları Yapıya Göre | |
| a) DNA Koruyucu | Süperoksit dismutaz enzimleri 1 ve 2, glutatyon peroksidaz, DNA tamir enzimleri (poli (ADP-riboz) polimeraz)), indirgenmiş glutatyon, sistein |
| b) Protein Koruyucu | Koruyucu antioksidanlar ile metal geçişinin sökestrasyonu, antioksidan enzimler |
| c) Lipid Koruyucu | α -tokoferol (vitamin E), askorbat (vitamin C), karotenoidler (retinol - vitamin A), indirgenmiş ubiquinone, indirgenmiş glutatyon, glutatyon peroksidaz, bilirubin |
| Çözünübilirliğine Göre | |
| a) Suda Çözünebilen | Haptogloblin, serüloplazmin, albümin, askorbat, ürik asit, indirgenmiş glutatyon, polifenolik flavonoidler |
| b) Yağda Çözünebilen | α -tokoferol, karotenoidler, bilirubin, quinonlar (indirgenmiş ubiquinon) |
| Kaynağına Göre | |
| a) Diyetle Alınabilen Ekzojenler | Karotenoidler, askorbik asit, tokoferoller, folik asit, sistein |
| b) Vücut Tarafından Sentezlenen Endojenler | Katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon-s transferaz, indirgenmiş glutatyon, seruloplasmin, transferrin, ferritin |

Süpürücü, “Scavenging” antioksidanlar (Tablo 1) süperoksit ve hidrojen peroksidin uzaklaştırılmasını ve metal iyonlarının ayrılmasını sağlar. Fenton reaksiyonunun gerçekleşmesini ve bu reaksiyon sonucunda oluşacak hidroksil radikalinin açığa çıkmasını engelleyerek fonksiyon görür. Zincir kırıcı antioksidanlar

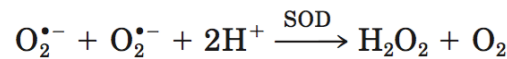
esas fonksiyonlarını hücre dışı sıvılarda gösterirler. Yağda çözünebilen antioksidanlar hücre membranını lipit peroksidasyonuna karşı korurlar. Suda çözünebilen antioksidanlar ise hücre dışı sıvılarda etkinliklerini gösterir (47).

Bununla birlikte birçok antioksidanın iki hatta bazılarının üçlü fonksiyonu olduğu belirlenmiştir. Örneğin, askorbat zincir kırıcı özelliği ile koruyucu bir antioksidandır. Okside formu olan α -tokoferolü (vitamin E), koruyucu özelliği ile metal iyonlarını bağlayabilir (48). Benzer şekilde, hücre içi enzimlerden bazıları (süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz) koruyucu antioksidanlar olarak görev alır (49,50).

Bir antioksidanın etkinliği bulunduğu yere (hücre içi/hücre dışı/membrana bağlı), ROT atağının doğasına, beraber etki gösterdiği antioksidan türüne (51) ve PH, oksijen basıncı gibi çevresel koşullara bağlıdır.

2.5.3.1. Süperoksit Dismütaz

Oksijen varlığında yaşayan tüm hücreler SOD içermektedir. Hem sitozollerinde, hem de mitokondrielerde bulunan SOD süperoksit radikallerini etkisizleştirerek hücreleri süperoksit radikalinin zararlı etkilerinden korur. Süperoksit Dismütaz yüksek derecede reaktif süperoksit anyonun $O_2^{\bullet-}$ 'ye ve daha az reaktif madde olan H_2O_2 'ye bozunmasını katalize eden antioksidan bir enzimdir. Peroksit, katalaz (CAT) veya glutatyon peroksidaz (GSH Px) reaksiyonları ile yıkılabilir. Reaktif süperoksit anyonun O_2 ve H_2O_2 'ye dönüştürülmesi aşağıdaki formülde özetlenmiştir (52):



İnsanlarda sitozolik (Cu/Zn-SOD), mitokondriyal (Mn-SOD) ve hücre dışı (EC-SOD) olmak üzere üç farklı formda SOD bulunmaktadır. SOD reaksiyon hızlarının çok yüksek olduğu aktif alanlarda geçiş metali iyonunun başarılı bir şekilde oksidasyonu ve indirgemesi ile $O_2^{\bullet-}$ 'i yok eder. Süperoksit dismutaz'ın her formu azid ve florür gibi tek yüklü anyonları bağlar; ancak Fe-, Mn⁻ veya Cu/Zn-SOD'lara karşı

duyarlılıklarında belirgin farklar vardır. Sitozolik-SOD, N_3^- , CN^- ve F^- tarafından yarışmalı olarak inhibe edilebilirler (52).

Mitokondriyal-SOD, süperoksit'in iki aşamalı dismutasyonu sırasında Mn (III) 'ten Mn (II)' ye ve Mn (III) 'e dönüştüğü bir döngüde alt birim başına bir manganez atomu içeren bir homotetredir (96 kDa). Mitokondrideki solunum zinciri oksijen radikallerinin ana kaynağıdır. Mn-SOD sitokinler vasıtasıyla bu solunum zincirini büyük oranda indüklediği ve depresyona uğrattığı gösterilmiştir (52).

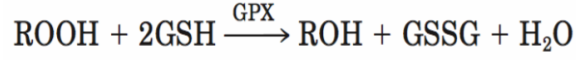
Sitozolik -SOD (SOD-1) ise diğer bir enzim formudur. Bu enzimlerin yaklaşık 32 kDa'lık iki aynı alt birime sahip olmalarına rağmen monomerik yapı olarak da *Escherichia coli*'de ağır protein konsantrasyonunda bulunabilir. Her alt birimi, histamin kalıntısı ile köprülenmiş bir bakır ve bir çinko atomu tarafından oluşturulmuş aktif alan metal kümesini içerir. Cu/Zn-SOD'nin antioksidan savunmanın ilk hattında önemli bir rol oynadığına inanılmaktadır. 25 ppm Cu ve 100 ppm Zn ile takviye edilmiş sütle beslenen buzağılarda daha güçlü bağışıklık yanıtı ve daha yüksek bir SOD aktivitesi görülmüştür. SOD ile ilgili güncel raporlarda, Mn-SOD'un yaşam için vazgeçilmez olduğunu buna karşın Cu/Zn-SOD'un gerekli olmadığı ortaya koyulmuştur.

Hücre dışı süperoksit dismutaz (EC-SOD) tetramerik, bakır ve çinko içeren glikoproteindir. Heparin ve heparan sülfat gibi bazı glikozaminoglikanlar için yüksek afiniteye sahiptir. Plazma, lenf ve sinoviyal sıvıdaki SOD aktivitesinin çoğunu oluşturan hücre dışı-SOD dokularının interstisyel boşluklarında ve hücre dışı sıvılarında bulunur. Hücre dışı-SOD, substratlar veya diğer oksidanlar tarafından indüklenmez. Memeli dokulardaki hücre dışı-SOD'nin düzenlenmesi oksidanlara olan bireysel hücre cevabına göre değil sitokinler tarafından koordine edilerek gerçekleştirilmektedir (52).

2.5.3.2. Glutasyon Peroksidaz

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), yapısında dört özdeş selenyum (Se) alt birimi içerir ve her birimde enzim aktivitesi için gerekli olan tek bir seleno-sistein (Sec) kalıntısı içerir. GSH-Px (80 kDa), hidroperoksitlerin glutasyon (GSH) kullanılarak

indirgenmesini katalize eder. Böylece memeli hücrelerinin oksidatif hasara karşı korunması sağlanır. Glutasyon metabolizması en önemli antioksidatif savunma mekanizmalarından biridir. Hidroperoksitlerin GSH kullanılarak indirgenmesi aşağıda formülize edilmiştir:



Memelilerde beş tane GSH-Px izoenzimi vardır. Bu enzimler vücudun her bölgesinde bulunur ama her izoformun seviyesi doku türüne bağlı olarak değişmektedir. Sitozolik (cGSH-Px) ve mitokondriyal glutasyon peroksidaz (GSH-Px1) glutatinin yapısını oluşturan yağ asidi hidroperoksitlerini ve H₂O₂'yi indirger. GSH-Px1 ve fosfolipid hidroperoksit glutasyon peroksidaz (PHGSH-Px/GSH-Px4) çoğu dokuda bulunmaktadır. GSH-Px4 hem sitozol hem de membran fraksiyonunda bulunur. PHGSH-Px, peroksitlenmiş membranlarda ve oksitlenmiş lipoproteinlerde üretilen fosfolipid hidroperoksitleri, yağ asidi hidroperoksitlerini ve kolesterol hidroperoksitleri direkt olarak indirgeyebilir. GSH-Px1 ağırlıklı olarak eritrositlerde, böbreklerde ve karaciğerde bulunmaktadır. GSH-Px4 böbrek epitel hücrelerinde ve testislerde yüksek oranda eksprese edilmektedir. Sitozolik GSH-Px2/GSH-Px-G1 ve ekstraselüler GSH-Px3/GSH-Px-P, gastrointestinal sistem ve böbrek haricinde çoğu dokuda az oranda tespit edilmiştir. Son zamanlarda fare epididimisinde spesifik olarak selenyumdan bağımsız olarak eksprese edilmiş yeni bir üye GSH-Px5 tanımlanmıştır (52).

Glutasyon peroksidaz zar fosfolipitlerinden fosfolipaz A2 tarafından salınan lipit hidroperoksitlere etki etmektedir. Fagositik hücrelerde önemli bir fonksiyonu vardır. Solunum patlaması sırasında serbest radikal hasarı sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini engeller. GSH-Px aktivitesindeki azalma, hidrojen peroksit birikmesine ve hücre hasarına neden olur. GSH-Px, lipit peroksidasyonunun başlamasını önler ve lipit peroksidasyonu sonucu oluşan lipit hidroperoksitlerin metabolizmasını sağlamakta ve düzenlemektedir (41).

2.6. Periodontal Hastalıkta Reaktif Oksijen Türleri ve Antioksidanlar

Kronik enflamatuvar koşulların genellikle artan oksidatif stres ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Nötrofilleri içeren fagositler, fagositoz sırasında oksidatif stres oluşması nedeniyle hastalık patogenezinde rol oynadığı düşünülmektedir. Başlangıçta, ROT'nin doğrudan mikrop öldürücü olduğu düşünülmüştür. Ancak son çalışmalarda, ROT'nin esas rollerinin, sitoplazmik granüller kaynaklı vaküollerden salınan enzimler sayesinde, öldürme ve sindirim için uygun bir çevreyi sağlaması olduğu belirtilmiştir (53).

Periodontitis ve sağlıklı durumda izole edilen nötrofillerin ROT aracılı olarak hücre veya hücre dışı matris bileşenlerine hasarını araştıran herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak kanıtlar periodontitiste nötrofillerin ROT üretimi açısından hiperaktif bir fenotip sergilediğini ortaya koymaktadır (14).

Reaktif oksijen türlerinin periodontal hastalıkta kemik rezorpsiyonu üzerindeki etkileri araştırılmamış olsa da süperoksit ve hidrojen peroksit gibi bazı ROT'lerin osteoklastları aktive ettiği (54,55) ve osteoklast oluşumunu teşvik ettiği gösterilmiştir (56). İlave olarak, osteoklastlar kemik ara yüzünde ROT ürettiği ve böylece resorpsiyon sürecinde daha doğrudan rol oynayabileceği belirtilmiştir (57,58). Hidroksil radikallerinin ve daha az orandaki hidrojen peroksitlerinin alveolar kemik proteoglikanlarını in vitro ortamda bozabildiği gözlenmiştir (59).

Reaktif oksijen türlerinin bağ dokusuna doğrudan etkisi çeşitli enflamatuvar hastalıklarda incelenmiştir (60,61). Ayrıca, periodontal hastalıkta bağ dokularının kollajen ve kolajenöz olmayan yapılarına etkisi de araştırılmıştır (62). Reaktif oksijen türlerinin dişeti hücreleri ve bağ dokusu bileşenleri üzerine etkisini, in vivo nötrofil kaynaklı ROT üretimini taklit eden in vitro ortamlar oluşturularak da inceleyen çalışmalar mevcuttur (63).

Reaktif oksijen türlerinin ekstraselüler matrikse olan etkisine de değerlendirilmiş ve domuz dişetinden elde edilen proteoglikanları ayrıştırdığı gösterilmiştir (63). Moseley ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda, bir dizi ROT'nin

periodonsiyumun yumuşak ve kalsifiye dokularında bulunan glikozaminoglikanlar (GAG) ve proteoglikanlar üzerindeki etkilerini araştırdı. Bu çalışmaların sonucunda GAG'lerin hidroksil zincir yapılarının radikali varlığında çeşitli derecelerde depolimerizasyona ve kalıntı modifikasyonuna uğradığı bildirilmiştir (64,65). Ek olarak, alveolar kemiğin kondroitin sülfat proteoglikanlarının, hem çekirdek proteinlerini hem de GAG zincirlerini bozan hidroksil radikali hasarına karşı özellikle duyarlı oldukları gösterilmiştir (59).

İn vitro çalışmalarda ROT'nin, tip I kollajen üzerinde çeşitli etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (60,66). Kollajen yapısındaki yüksek oranda bulunan prolin/hidroksiprolin kısmı ROT hasarına özellikle duyarlıdır. Süperoksit anyonları ve hidroksil radikalleri, hidroksiprolin içeren peptitleri serbest bırakarak, kollajeni prolin ve hidroksiprolin kalıntılarını küçük peptitlere ayırırlar (67). Kollajenin diğer proteinlere benzer şekilde malondialdehit gibi lipid peroksidasyon ürünleri ile etkileşime girebileceği gösterilmiştir (68). Normal şartlar altında hücrelerin hareketinin kontrolü ve bağ dokusu hücrelerinin fonksiyonu için kollajen ve ekstraselüler matriksin diğer bileşenleri çok önemlidir (69). Bu etkileşim ile ROT tarafından dolaylı olarak fibroblast adhezyon, proliferasyon ve hücre ömrü gibi fonksiyonlarını önemli ölçüde değiştirebileceği bildirilmiştir (70).

Periodontal dokulardaki ROT ile modifiye albümin, nötrofillerin hastalık bölgesine akımını artırabilir. Hastalıklı dişeti oluşu sıvısında ve dokulardaki metalloproteinazlar ve bunların doku inhibitörleri arasındaki dengesizlik, matris metalloproteinazların (MMP) doku inhibitörünün doğrudan hasar vermesine neden olabilir (71-73). Bu hasarın periodonsiyum hücrelerinde ROT'nin sebep olabileceği etki ile MMP'ler ve bunların doku inhibitörlerinin ekspresyonunda meydana gelebilecek değişikliklerden kaynaklanabileceği belirtilmiştir (74-76).

Periodontitis hastalarındaki diş eti dokusu örneklerinde mitokondriyal DNA delesyonları bulunmuştur. Oksidatif hasardan kaynaklanan bu mitokondriyal DNA delesyonları yaşlanmayla ve çeşitli kronik hastalıklarla ilişkili olduğu bilinmektedir (77). Dahası bu hasarın elektron taşımada görevli proteinlerin ekspresyonunu azaltıp

oksidatif stresin daha da artmasına sebep olarak hücreyi ölüme götürebileceği belirtilmiştir (78).

2.6.1. Malondialdehit ve Periodontal Hastalık

Literatürde yayınlanan çalışmalara bakıldığında, ROT'nin lipitle reaksiyonları sonucu ortaya çıkan belirteçlere odaklanılmıştır. Genel olarak lipit peroksidasyonun üç ana belirteci, tiyobarbitürik asit reaktif madde (TBAR), malondialdehit (MDA) ve izoprostanlardır. İzoprostanlar mevcut en iyi belirteç olarak kabul edilmiştir (79,80). Bugüne kadar sadece TBAR ve malondialdehit kronik periodontitiste araştırılmıştır (81,82). Literatür incelendiğinde kronik periodontitisli hastalarda, periodontal sağlıklı kontrollere göre daha yüksek seviyede lipit peroksidasyonu görüldüğü bildirilmiştir. Bu çalışmalarda TBAR sistemik olarak plazmada, eritrositlerde (82) ve lokal olarak da doku homojenatlarında tespit edilmiştir (51,81,82). Periodontitisli hastaların DOS ve tükürük MDA seviyelerinin sağlıklı kontrollere göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (37,81).

Sıçanlarda ligatür ile oluşturulan periodontitis modeli çalışmalarında MDA seviyeleri değerlendirilmiştir. Bu çalışmalar diğer çalışmaları destekler nitelikte olup sıçanların serumunda (83) ve diş eti örneklerinde (84,85) kontrol grubuna kıyasla daha fazla lipit peroksidasyonu olduğu görülmüştür. İlginç bir şekilde, ligatürden kaynaklanan enflamasyonun gelişimi ve görülen malondialdehitin artışı nitrik oksit sentaz inhibitörünün (aminoguanidin) (84) indüklenmesiyle veya süperoksit anyonları ortadan kaldıran bir süperoksit dismutaz kullanımıyla önemli ölçüde azaltılabildiği görülmüştür (85). Periodontitis hastalarında başlangıç periodontal tedavi sonrası iyileşmeyen alanlarda TBAR miktarı, bu bölgelerden alınan diş eti oluğu sıvısı IL-1b miktarı ile ilişkili bulunmuştur (81). İlave olarak başarılı bir periodontal tedaviden sonra tükürük ve diş eti oluğu sıvısı MDA seviyelerinin azaldığı bildirilmiştir (86).

2.6.2. Süperoksit Dismutaz ve Periodontal Hastalık

Tüm aerobik hücrelerde bulunan oldukça önemli olan SOD enzimi, canlı dokulara fazla zarar verme potansiyeli olan süperoksit radikalini etkisizleştirerek

hücreleri radikallerin zararlı etkilerinden korur. Kan damarları, kalp, akciğerler, böbrekler ve plasenta dahil olmak üzere birçok dokuya, heparine ve tip I kollajene yüksek düzeyde bağlanabilen süperoksit dismutaz ekspresyonunun artırılması ile süperoksidin zararlı etkilerinin azatılabileceği ve bu durumun bir tedavi stratejisi olabileceği düşünülmektedir (87). Ekstraselüler süperoksit dismutaz aktivitesinin olmaması, ateroskleroz, hipertansiyon, koroner arter hastalığı ve diyabetik vaskülopati gibi bir takım hastalıkların ilerlemesinde rol oynayabileceği bildirilmiştir (88).

Periodontoloji literatüründe SOD ile ilgili yayınlanan birçok çalışma mevcuttur. Deneysel Periodontitis oluşturulan sıçanlarda yapılan bir çalışmada ligatür kaynaklı enflamasyon varlığında MDA seviyesinin artışının süperoksit dismutaz kullanılmasıyla önemli ölçüde azaltılabildiği belirlenmiştir. Aynı çalışmada SOD'nin myeloperoksidaz aktivitesini ve kemik kayıplarını da azalttığı tespit edilmiştir (85). Sobaniec ve ark. sıçanlarda DP oluşturduğu bir çalışmada SOD, glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutatyon redüktaz enzimlerinin az olduğu grupta lipit peroksidasyon belirteci olan serum MDA düzeylerinin yükseldiğini rapor etmişlerdir (83). Diğer bir çalışmada Akalin ve ark. 26 periodontitisli ve 16 periodontal olarak sağlıklı toplam 42 hastanın bağ dokusu ve diş eti SOD düzeylerini incelemişlerdir. Periodontitisli hastalarda SOD seviyelerinin sağlıklı bireylere göre çok daha fazla olduğu bildirilmiştir (89). Farklı olarak Ellis ve ark. 44 kişide yaptığı bir çalışmada periodontal cep derinliğinin artış gösterdiği bölgelerde katalaz ve SOD seviyelerinin azaldığını bildirmişlerdir (90).

2.6.3. Glutatyon Peroksidaz ve Periodontal Hastalık

Glutatyon (GSH) metabolizması en önemli antioksidatif savunma mekanizmalarından biridir. Serbest radikal hasarı sonucu fagositik hücrelerinin zarar görmesini engeller. Glutatyon peroksidaz aktivitesindeki azalma, hidrojen peroksit birikimine ve hücre hasarına neden olur. GSH-Px, lipit peroksidasyonunu önler ve lipit peroksidasyonu sonucu oluşan lipit hidroperoksitlerin metabolizmasını düzenler (41). Bakteriyel ürünler, viral proteinler, sitokinler, büyüme faktörleri ve oksidatif stres gibi etkenlerle aktif olan NF- κ B ve aktive edici protein 1 (AP-1) gibi redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerini aktive eder. Bu aktivasyon enflamasyonda önemli genlerin

transkripsiyonları ile doku remodelasyonunu, hücre proliferasyonu, apoptozis ve tamir mekanizmalarını düzenler (91). Reseptör sinyal yolları, redoks dengesindeki lokal değişiklikler ile kontrol edilir (92-94). Bu dengede GSH ve GSH-Px enziminin varlığı oldukça önemlidir. Glutasyon, okside (GSSG) ve indirgenmiş (GSH) formlarında bulunabilir. Redox dengesinde GSH/GSSG oranı da rol sahibidir. Glutasyon peroksidaz ise bu oranı düzenler (92,95).

Deneysel periodontitis oluşturulan sıçanlarda serum GSH-Px, SOD düzeylerinin düşük olduğu durumlarda serum MDA düzeylerinin yükseldiği bildirilmiştir. Sobaniec'in sıçanlarda yaptığı DP çalışmasında serum SOD, GSH-Px, glutasyon redüktaz enzimlerinin az olduğu test grubunda lipid peroksidasyonunu gösteren serum MDA seviyesinin yükseldiği tespit edilmiştir (83). Wei ve ark. DOS GSH-Px ve laktoferrin seviyelerinin periodontitis hastalarında artış gösterdiğini bildirmişlerdir (96,97). Ancak farklı olarak Huang ve ark. periodontitis hastalarında DOS GSH-Px düzeyinin cep derinliği ve ataşman kaybı ile negatif bir ilişki gösterdiğini ve tedaviden sonra ise GSH-Px düzeylerinin artış gösterdiğini tespit etmişlerdir (98).

Yapılan birçok laboratuvar ve klinik araştırmada yumuşak ve sert doku metabolizması üzerinde yeni yaklaşımlar geliştirmek amacıyla antioksidan özelliği olan tahıl ürünleri, sebzeler, baharatlar, çeşitli otlar, bitki özütleri ve vitaminler kullanılmıştır (99). Akdeniz diyetinin zengin içeriğini oluşturan zeytin ve zeytinyağında bolca bulunan HT bunlardan bir tanesidir.

2.7. Hidroksitirosol

Günümüzde, Akdeniz diyetinin insan sağlığına oldukça faydaları olduğu bilinmektedir. Akdeniz diyeti başlangıç olarak, 1960'lı yıllarda Akdeniz Havzasındaki zeytin yetiştirme bölgelerinin diyeti olarak tanımlanmıştır. Akdeniz diyeti, ana yağ kaynağının zeytinyağı olduğu bitki besinlerinden kaynağını almaktadır (100).

Hidroksitirosol (HT), Akdeniz diyetinin ana yağ kaynağı olan zeytin ve zeytinyağında doğal olarak bulunan (3,4-dihidroksifenil etanol) oleuropein

hidrolizinden oluşan fenolik bir bileşiktir (101). Hidroksitirozol asıl olarak oleuropeinaglikon ve elenolik asitten oluşmaktadır. Bu bileşikler de kaynağını zeytin ürünlerinden özellikle zeytinyağından almaktadır. Hidroksitirozol molekül ağırlığı 154.16 ve erime noktası 55°C olan beyaz bir tozdur. Suda ve düşük molekül ağırlıklı alkoller gibi polar organik çözücülerde kolayca çözünebilmektedir (100). Zeytin ağacının meyvesinde ve yaprağında, zeytinyağında ve kırmızı şarapta çok miktarda bulunan HT amfipatik özelliğe sahiptir (100,102,103).

2.7.1. Hidroksitirozol'ün Emilimi ve Biyoyararlanımı

Biyoyararlanım terimi bir maddenin hem emilimi hem de lokal metabolik dönüşümü göz önünde bulundurarak oral yoldan verildikten sonra sistemik dolaşıma ulaşan oranını belirtmek için kullanılmaktadır (100).

Visioli ve ark. (104) zeytinyağında farklı fenolik miktarların alınması ile insan idrarındaki HT arasında yüksek korelasyon tespit edilmiştir. Miró-Casas ve ark. (105) bir hafta boyunca diyetle zeytin yağı alınması sonrası HT emilimini araştırmış ve günlük 25ml zeytin yağı kullanımının HT ihtiyacını % 121.1 oranında tamamlandığını tespit etmişlerdir. Emilen HT miktarını belirlemek için farklı teknikler kullanılarak yapılan araştırmalarda yağda yaklaşık %99, sulu çözeltide yaklaşık %75, feçes içeriğinde yaklaşık %3 civarında emiliminin gerçekleştiği belirtilmektedir (106).

2.7.2. Hidroksitirozol ve Toksikite

Toksikite; kimyasal veya fiziksel bir etkenin neden olduğu biyolojik zarar veya dokuya zarar verme kapasitesi anlamındadır (107).

Auñon-Calles ve ark. (107) HT'yi 13 hafta boyunca günlük 5mg/kg, 50mg/kg ve 500mg/kg dozlarında sıçanlara gavaj yoluyla uygulamışlar ve HT'nin toksikolojik etkilerini değerlendirilmiştir. Aynı çalışmada sıçanların klinik bulguları, idrak kabiliyeti, lokomotor aktivitesi, gıda tüketimi, vücut ağırlığı, hematolojisi, klinik biyokimyası, patolojisi, organ ağırlıkları ve mikroskopik bulguları incelenmiştir. Sonuç olarak toksikoloji ile ilişkili herhangi bir durum tespit edilmemiştir (107). Diğer taraftan

HT'nin yüksek doz kullanımı ile uzun dönemde oluşturabilecek etkileri ile ilgili bilgi sınırlıdır (100).

2.7.3. Hidroksitirozol ve Etki Mekanizması

Hidroksitirozol, oksidasyon reaksiyonlarının artmasından sorumlu peroksil radikallerini nötralize eden zincir kırıcı antioksidan fenol bileşimidir. Fenol bileşikler organik moleküllerin oksidasyonunu önleme veya geciktirme özelliklerine sahiptir (108). Fenoller bu özelliğini, moleküler yapısı içerisinde bulunan bir Hidrojen atomunun protonunu ROO[•] zinciri taşıyan radikallerin elektronlarına aktararak gerçekleştirmektedir (108). Fenoller anti-enflamatuvar etkilerini ise siklooksigenaz ve lipoksigenaz enzim inhibisyonu yaparak ve ilave olarak nötrofil, mast hücreleri ve makrofajlar gibi immün hücrelerin enzimlerini engelleyerek göstermektedir (109). Fenolik bileşikler “Non Steroidal Anti-inflammatory Drugs”, “Steroid Olmayan Anti-enflamatuvar İlaçlar” NSAID'lere benzer bir mekanizma gösterir ve pro-enflamatuvar sitokinlerin aktivitesini ve gen ekspresyonunu inhibe eder. Ayrıca fenollerin enflamasyon ve antioksidan yollarında NF-κB ve Nuclear Factor Erythroid-related Factor 2 (Nrf-2) gibi transkripsiyon faktörlerini düzenlediği bildirilmiştir (110,111).

2.7.4. Hidroksitirozol ve Enflamatuvar Hastalıklar

Hidroksitirozol'ün anti-enflamatuvar ve antioksidan etkileri ile akut ve kronik pek çok hastalığa karşı yararlı ve koruyucu özelliklerinin olduğu bildirilmiştir. Hidroksitirozol kardiovasküler sağlığı artırdığı (25), endotelial disfonksiyon riskini azalttığı (27), DNA hasarını ve tümör hücre proliferasyonunu engellediği (26), romatoid artrit hastalığında ödemi ve doku yıkımını azalttığı (112), diyabetli ratlarda nöroprotetik etkiye sahip olduğu (99) rapor edilmiştir.

Zeytinyağını ihtiva eden Akdeniz diyetinin ön planda olduğu bölgelerde düşük mortalite ve morbidite olduğu tespit edilmiştir. Bu durumu açıklamak amacıyla fenolik bileşikler üzerinde araştırmalar yapılmıştır (113). İlgili araştırmalarda, iki izole bileşik olan oleuropein ve hidroksitirozol özel ilgi alanı olmuştur Bu bileşikler, ateroskleroz gelişiminde rol alan düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidasyonu, trombosit

agregasyonu ve diğer faktörlerin inhibisyonu gibi anti-enflamatuvar ve anti-aterojenik özellik göstermektedir (114). Bu bileşiklerden biri olan HT'nin kardiyovasküler sağlık üzerine etkilerinin olduğu tespit edilmiştir (25).

Reaktif oksijen türleri ateroskleroz gelişimine katkıda bulunan endotel disfonksiyonunda kritik rol oynamaktadır. Oksidatif stresle indüklenen endotel disfonksiyonu, aterosklerotik lezyonların gelişmesine neden olmaktadır (27,115). Damar duvarının yapışkanlığın artması, dolaşımdaki bağışıklık hücrelerinin lokal infiltrasyonu için mükemmel bir çevre sağlar ve bu da kronik enflamasyona neden olur (116). Bu nedenle, ROT seviyelerinin direkt olarak azaltılması ve/veya anti-oksidan sistemin uyarılması ile ateroskleroz gelişimi önlenmektedir. Hidroksitirozol'un endotel hücrelerdeki anti-oksidan savunma sistemini pozitif olarak düzenlediği ve kardiyovasküler hastalıkların önlenmesinde rol oynadığı göstermiştir. Yapılan bir hayvan çalışmasında domuz pulmoner arter endotel hücrelerinde H₂O₂ varlığında HT uygulamasının hücre içi ROT düzeyi artışına engel olduğu belirlenmiştir (117). Bir başka çalışmada HT'nin hiperlipidemik tavşanlardaki aortik lezyonların antioksidan sistem üzerindeki etkileri incelenmiş ve HT ile desteklenen gruplar kontrol grupları ile karşılaştırıldığında aort intimal tabakasında aterosklerotik lezyonların boyutunun azaldığı tespit edilmiştir (118).

Fenoller kanser hücre sinyallerinin kanser hücre döngüsünün ve enzimatik aktivitelerinin düzenlemesi gibi çeşitli özelliklere sahiptir. Zeytin ve zeytin ürünlerinde bulunan yüksek fenol konsantrasyonları, birçok kronik hastalık riskini azaltmak için kullanılmaktadır. Özellikle, sızma zeytinyağı tüketiminin kanser riskini azalttığı insan epidemiyolojik çalışmaları ile desteklenmektedir. Bu faydalar fenolik bileşiklere atfedilebilmektedir (119,120). Güçlü antioksidan, antiaterojenik, antitromboz ve antienflamatuvar etki gösteren HT zeytinyağının ana fenolik bileşenlerinden biridir (121). HT farklı genotoksik moleküller tarafından indüklenen DNA hasarını önlemekte, tümörlerin hücre dizilerinde çoğalmasını baskılamakta ve apoptozunu indüklemektedir. Böylelikle kanser hücresi oluşumunun hem başlatılmasını hem de ilerlemesini inhibe edebilmektedir (26,122).

Sıçanlarda yapılan bir çalışmada HT'nin romatoid artrit hastalığında ödemi, doku yıkımını, nitrik oksit sentezini ve kemik yıkımını azaltmasıyla yararlı olduğu belirlenmiştir (112). Böylece HT'nin romatoid artrit tedavisinde yararlı olabileceği, sadece kronik iltihaplanmada değil aynı zamanda akut iltihaplanma süreçlerinde de önemli etkiye sahip olabileceği bildirilmiştir (112). Başka bir hayvan deneyinde HT'nin diyabetli ratlarda nöronların korunmasında olumlu etkiye sahip olduğu gözlenmiştir (99).

İn vivo hayvan çalışmaları değerlendirildiğinde HT'nin güçlü antienflamatuvar etkileri görülmektedir. Fare ayağı tabanında ödem oluşturulan bir çalışmada araşidonik asiti prostaglandine çeviren COX1 ve COX2'nin HT ile indüklendiği görülmüştür (123). Yapılan çalışmalarda HT'nin güçlü antienflamatuvar etkili ajan olabileceği bildirilmiş ayrıca NO üretimini, proenflamatuvar sitokinlerin (IL-1a, IL-1B, IL-6, IL-12, TNF-a) ve prostaglandin E2 üretimini de düşürdüğü bildirilmiştir (124). Hidroksitirozol'un antiproliferatif, antioksidan ve antiinflamatuvar etkilerini inceleyen başka çalışmada IL-6 seviyesini düşürdüğü, antioksidan sistemi aktive ettiği ve yağ oluşumundaki enzimlerin inhibisyonuyla antiproliferatif etki gösterdiği gözlenmiştir (125).

2.7.5. Hidroksitirozol ve Periodontal Hastalık

Son yıllarda gıda üretimi ve ilaç sanayisinde doğal antioksidan madde ihtiva eden besinlerin kullanımındaki artış ile birlikte zeytin, zeytin yaprağı ve zeytin ürünlerinin sağlık üzerindeki olumlu etkileri fark edilmiş ve bu alanda çalışmalar gittikçe artmıştır (100). Yapılan çalışmalara göre, zeytinyağının en fazla koruyucu yağ asidi oranına sahip olduğu ve meme kanserinde etkili olabileceği bildirilmiştir (126). Zeytin yağı tüketimiyle, hipertansiyon insidansının azaldığı görülmüştür (127).

Zeytinde bulunan fenolik bileşiklerin (tirozol, hidroksitirozol, oleuropein, hidroksitirozol asetat, 3-4-dihidroksifeniletanol-elenolik asit dialdehit, 3-4-dihidroksifeniletanol-elenolik asit) meme, mide, kolon, yumurtalık gibi kanser hücreleri üzerinde inhibe edici etkisinin olduğu bildirilmiştir (128,129). Zeytinde

bulunan başlıca fenolik yapılardan bazılarının güçlü antioksidan ve serbest radikalleri inhibe edici özelliklerinin olduğu tespit edilmiştir (103). Zeytinyağındaki fenolik bileşiklerin farmakolojik aktivitelerin kanserde, kalp damar hastalıklarında ve Alzheimer hastalığında faydalı olabileceği bildirilmiştir (130).

Zeytin yağının önemli ana fenolik bileşiklerinden biri olan HT'nin, yapılan prelinik çalışmalarda pek çok hastalığa karşı yararlı ve koruyucu özellikleri olduğu bulunmuş ve rapor edilmiştir. Hidroksitirosol kardiovasküler, kanser, AIDS e karşı bioavantajlarının olduğu gösteren çalışmalar da mevcuttur (121).

İn vivo hayvan çalışmaları değerlendirildiğinde HT'nin periodonsiyum üzerine olan etkisinin tavşanlar üzerinde araştırıldığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada kardiyovasküler hastalıklar ile periodontal hastalık ilişkisi göz önünde bulundurulmuş ve HT uygulamasının antienflamatuvar etkisi değerlendirilmiştir. Bu çalışmada tavşanlar 80 gün boyunca doymuş yağ açısından zengin bir diyet ile beslenerek ateroskleroz geliştirilmiştir. Aterosklerotik tavşanların dişeti mukozasında kontrollere kıyasla daha yüksek fibrozis ve endotelial aktivasyon olduğu görülmüş ve HT uygulaması ile endotelial aktivasyonun ve fibrozisin azaldığı rapor edilmiştir (131). Periodontal sağlığı değerlendiren diğer bir çalışmada, yaşı ileri sıçanlara sızma zeytinyağı diyeti uygulanması ile alveoler kemik yıkımının azaltılabileceği bildirilmiştir (132).

Periodontal yıkımda reaktif oksijen türleri ile antioksidan sistem arasındaki homeostatik denge oldukça önemlidir (14). Periodontal dokularda oksidatif stresin oluşmasıyla artan yumuşak ve sert doku yıkımı antioksidan sistem ile dengelenmektedir. Zeytinyağının ana fenolik bileşeni ve etkili bir antioksidan olan HT'nin kronik enflamatuvar hastalıkların gelişiminde koruyucu rolü olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada HT uygulaması ile periodontal hastalık gelişiminde oksidatif stresin düzenlenebileceği, alveolar kemik kaybının ve enflamasyon bulgularının azaltılabileceği varsayılmaktadır. Bilgilerimiz dahilinde HT'nin kronik enflamatuvar bir hastalık olan periodontal hastalık gelişimindeki rolü araştırılmamıştır.

Tüm bu bilgiler ışığında, bu çalışmanın amacı DP oluşturulan sıçanlarda sistemik HT uygulamasının;

1. Alveolar kemik yıkımına olan etkisinin histopatolojik, histomorfometrik ve immünohistokimyasal olarak incelenmesi,
2. Dişeti ve serum MDA, SOD ve GSH-Px enzim düzeylerine olan etkisinin değerlendirilmesidir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma için Abant İzzet Baysal Üniversitesi (AİBÜ) Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan onay alındı (Karar numarası: 2016/41).

3.1. Deney Hayvanları ve Bakım Koşulları

Bu araştırmada kullanılan sıçanlar Ankara Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan temin edildi. 200-300 gram ağırlığa sahip, 10-12 haftalık 32 adet erkek Albino Wistar sıçan kullanıldı. Tüm hayvanlar AİBÜ Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezin'de (DEHAM), 12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde, uygun sabit ısı ($20^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$) ve nemli (%60-70) ortamda, 8'li gruplar halinde plastik tabanlı tel kafeslerde barındırıldı, adlibitum besin ve su ile beslenmeleri sağlandı.

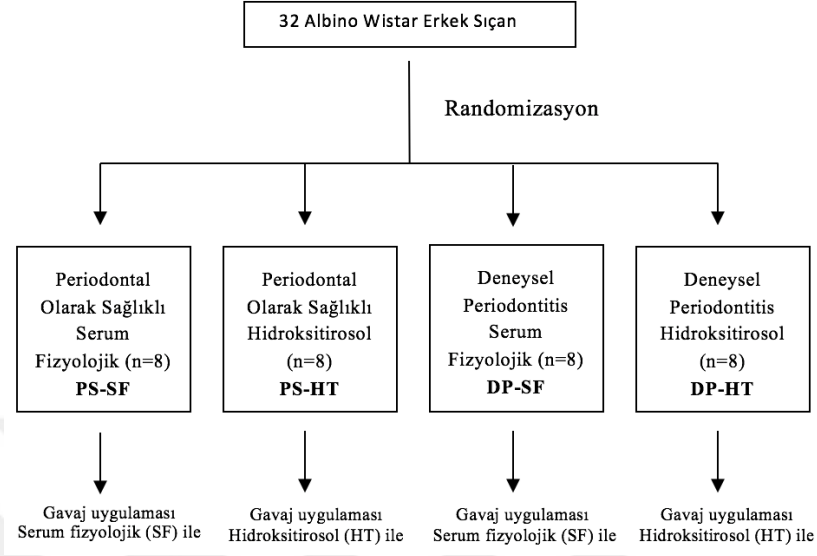
Periodontitis modeli oluşturabilmek amacıyla tüm sıçanların üst çene ikinci azı dişlerinin servikalleri etrafına aynı gün subgingival olarak 3/0 ipek sütür* (ligatür) yerleştirildi. Ertesi gün başlanarak takip eden 14 gün boyunca gavaj uygulandı. Onbeşinci gün uygun anestezi protokolü ile sıçanlar kardiyak kan alınarak sakrifiye edildi. Sıçanların üst çeneleri yumuşak dokular diseke edilerek alındı.

3.2. Çalışma Gruplarının Belirlenmesi

Çalışmaya dahil edilen 32 adet sıçan randomize olarak 4 gruba ayrıldı. 1) Periodontal olarak sağlıklı + serum fizyolojik (PS-SF), 2) Periodontal olarak sağlıklı + hidroksitirozol (PS-HT), 3) Deneysel periodontitis + serum fizyolojik (DP-SF) ve 4) Deneysel periodontitis + hidroksitirozol (DP-HT). Sonrasında HT ve SF uygulamaları gavaj yolu ile gerçekleştirildi.

* Doğan cerrahi ipek sütür, Lot No:048110, 20mm 3/8 keskin 75 cm.

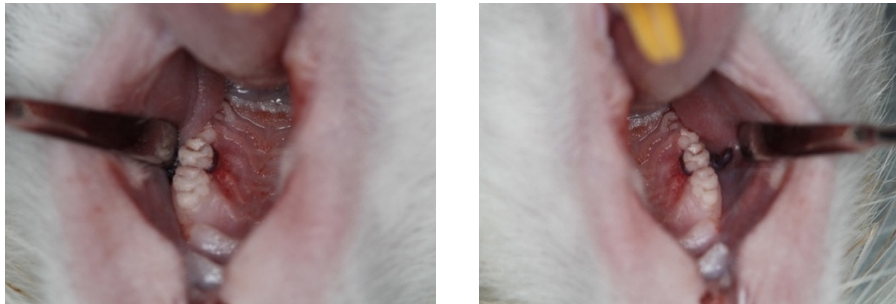
Araştırmadaki çalışma grupları **Şekil 4**'de özetlendi.



Şekil 4. Deney Hayvanlarının Randomizasyonu

3.3. Deneysel Periodontitis Oluşturulması ve Çalışma Protokolü

Deneysel Periodontitis modeli oluşturmak için sıçanlara 90mg/kg ketamine, 10mg/kg xylazine intramuskuler olarak uygulanarak sıçanlar anestezi altına alındı. Anestezi derinliği sıçanların pupil refleksi, ayak refleksi ve kas tonusu değerlendirilerek teyid edildi. Her sıçan için sağ ve sol üst 2. azı dişlerinin servikalleri etrafına 3.0 ipek sütür bir miktar subgingival olacak şekilde yerleştirilerek DP modeli indüklendi (**Fotoğraf 1**) (133).



Fotoğraf 1. Deneysel periodontitis modeli.

Süturlar 14 gün boyunca bölgede tutuldu ve 3 kez anestezi uygulanması olmaksızın kontrol edildi. Ligatürlerin bağlanmasını takiben hemen ertesi gün oral gavaj

uygulamalarına başlandı. Test gruplarındaki sıçanlara günde bir defa sabah saatlerinde olmak üzere 14 gün boyunca gavaj yoluyla HT verildi. Sıçanlara gavaj uygulanırken HT'nin lokal etkileri de düşünülerek gavaj enjektörü çekilirken ağız içerisine bir miktar daha HT verildi. Kontrol gruplarına test gruplarına yapılan aynı prosedürler uygulandı. Aynı şartların oluşturulması amacıyla gavaj enjektörü çekilirken SF ağız içerisine az miktar da olsa verildi.

HT'nin Hazırlanması ve Doz Ayarlanması:

Saflık oranı >85% olan (**Fotoğraf 3**) HT'nin [†] çözülmesi, seyreltilmesi ve dozunun ayarlanması önceki çalışmalar göz önünde bulundurularak belirlendi (112,134). Test gruplarına uygulanacak olan HT solüsyonu 1.4 ml %2'lik metanolde çözdürülerek ve 70ml serum fizyolojik (SF) ile seyreltilerek hazırlandı. Kontrol gruplarına uygulanacak olan solüsyon benzer metanol oranını içermesi amacıyla 70 ml SF ile 1.4 ml %2'lik metanol ile karıştırılarak hazırlandı (**Fotoğraf 2,3**).

European Food Safety Authority HT'nin kullanılması gereken fizyolojik alt sınırın 5 mg/kg olduğunu bildirmiştir (100). Literatür incelendiğinde HT'nin herhangi bir toksik reaksiyon olmaksızın günde 10 mg/kg dozunda uygulanmasının daha etkili olduğu tespit edildi (135). Bu bilgiler doğrultusunda bu çalışmada HT, her sıçana günde 10 mg/kg dozunda olacak şekilde her uygulamada toplam 4ml olarak uygulandı.



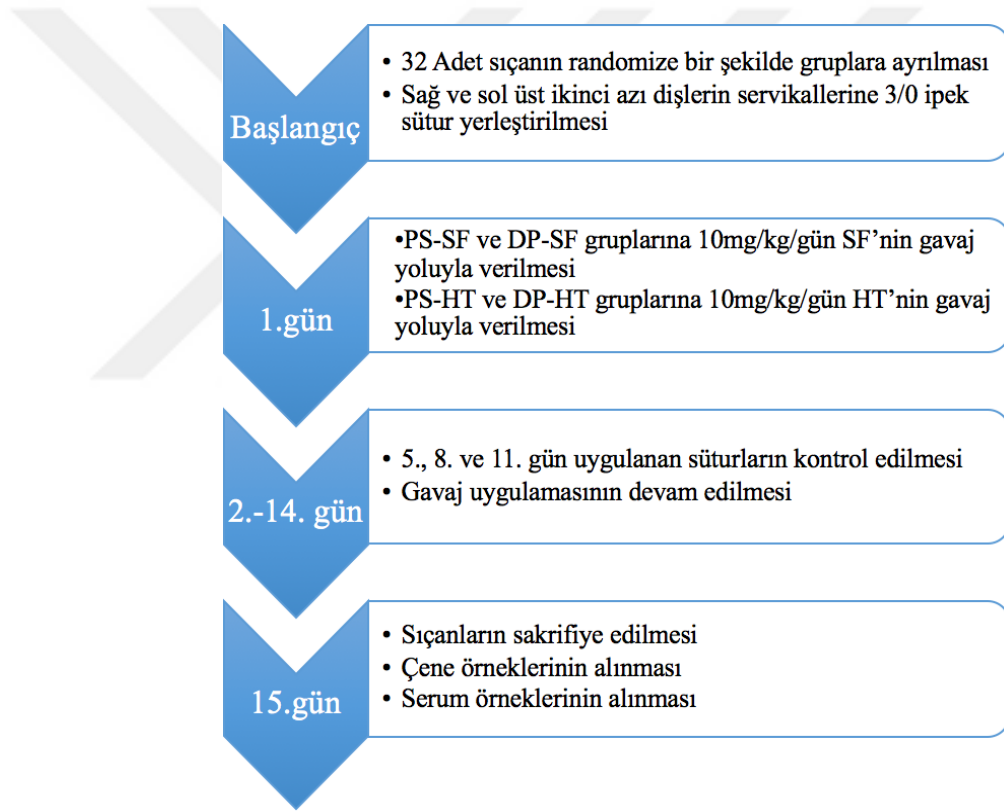
Fotoğraf 2. Hidroksitirozol.



Fotoğraf 3. HT/SF hazır formları.

[†] LGC, Cas No:10597-60-1, Hydroxy Tyrosol (>85% saflık), Toronto Ontario, Canada.

Sıçanlar sütür bağlanması sonrası 15. günde kardiyak kanları alınarak sakrifiye edildi. Üst çene kafatasından ayrıldıktan sonra karbon separe ile ikiye ayrıldı. İkiye ayrılmış çene örnekleri yazı tura atılarak randomize bir şekilde biyokimyasal ve histolojik değerlendirme için seçildi. Biyokimyasal değerlendirme için seçilen yarım çenelerin sütür çevresindeki 3mm diş eti dokusu (136) alındı. Alınan doku örnekleri “phosphate buffered saline” (PBS)[‡] ile fikse edildi ve incelenmek üzere biyokimya laboratuvarına gönderildi. Histolojik inceleme için seçilen yarım çene örnekleri ise %10'luk nötral formaldehit solüsyonunda fikse edilerek incelenmek üzere histoloji laboratuvarına gönderildi. Çalışma protokolü **Şekil. 5**'de özetlendi.



Şekil 5. Deney Aşamaları

[‡] Panbiotech, P04-31500, 500ml, Germany.

3.4. Biyokimyasal Değerlendirme

Biyokimyasal değerlendirmeler Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakóltesi Biyokimya Anabilim Dalında geręekleřtirildi.

3.4.1. Serum ve Dişeti Örneklemleri

3.4.1.1. Serum Örneklemlerinin Elde Edilmesi

Çalışmada tüm sıçanlardan kan örnekleri alındı. Sıçanlar anestezi altındayken açık yöntem ile kardiyak kan örnekleri toplandı ve ötenaziyi hızlandırmak için aort kesilerek sakrifikasyon geręekleřtirildi. Alınan kan örnekleri sarı kapaklı 5 ml'lik jelli vakumlu serum separator tüpü (SST) içerisine alınarak +4°C'de 1200 g ve 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Alikotlanan serum örnekleri analiz yapılıncaya kadar -80°C de saklandı. Preanalitik etkilerin çalışma sonucuna olumsuz etkisini engellemek amacıyla tüm örneklerin toplanması, taşınması, işlenmesi ve saklanması aynı prosedürler uygulandı ve tüm analizlerin yapılması eş zamanlı olarak geręekleřtirildi.

3.4.1.2. Dişeti Dokusunun Elde Edilmesi ve Homojenizasyonu

İkinci azı dişi etrafındaki toplam 3mm'lik dişeti alındı. Elde edilen dişeti örnekleri 400 µL PBS ve %0.05 Tween-20 içeren steril tüplere yerleştirilerek -80°C'de saklandı. Analiz öncesi örneklerinin çözünmesi sağlandıktan sonra dokular hassas tartı ile tartılarak herbirinden eşit miktarda alınması sağlandı. Örneklerinin çözünmesi sonrası hassas tartı ile tartılan dokuların ortalama doku ağırlıklarının 25-50g. olduğu tespit edildi. Dokular temiz bir alanda bistüri yardımıyla olabildiğince küçük parçalara (1-2 mm³) kesildi. Her örnekte bistüri ve kullanılan ekipman değiştirildi. Örnekler PBS içinde 100mg doku / 100µL olacak şekilde çözdürüldü. Parçalanmış dişeti örnekleri havan yardımıyla ezildi. Ardından örnekler tüplere aktarılarak doku homojenizatörü[§] ile her örnek en az 10 dakika sürede tamamen parçalandı. Parçalanan dokular 1 ml PBS içinde homojenize edildi. Hücre membranının ayrılması için homojenizatlar -20⁰C'de

[§] IKA WERKE, Wilmington, USA

iki kere dondurulma çözüme işlemi uygulandı. Son çözüme işleminden sonra santrifüj edilen örneklerin süpernatantları üzerinde ölçümler gerçekleştirildi (99).

3.4.2. Serum ve Dişeti Örneklerinin Laboratuvar Analizleri

Dokuların homojenizasyonu ile elde edilen süpernatant ve serum örneklerinde Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)** , Malondialdehit (MDA)†† ve Süperoksit Dismütaz (SOD)‡‡ ölçümleri ELISA (Enzim-Linked Immunosorbant Assay) yöntemi ile kit prosedürlerine uyularak değerlendirildi. GSH-PX için lineer ölçüm aralığı 50-344 nmol/min/ml, gün içi tekrarlayıcılık %5.7, günler arası tekrarlayıcılık %7.2 idi. MDA için lineer ölçüm aralığı 0-50 nmol/ml gün içi tekrarlayıcılık %5.5, günler arası tekrarlayıcılık %5,9 idi. Süperoksit dismutaz için lineer ölçüm aralığı 0.005-0.05 units/ml, gün içi tekrarlayıcılık %3.2, günler arası tekrarlayıcılık %3.7 idi. Lineer aralık dışında kalan örnekler uygun dilüsyonlarla tekrar çalışıldı.

Serum gamma glutamil transferaz (GGT) (U/L), aspartat transaminaz (AST) (U/L), alanin aminotransferaz (ALT) (U/L), alkalin fosfataz (ALP) (U/L), kan üre azotu (UREA) (mg/dL) ve kreatin (CREA) (mg/dL) ölçümleri spektrofotometrik olarak enzimatik ve kolorimetrik yöntemlerle üretici talimatları doğrultusunda ölçüm cihazında§§ çalışıldı.

3.5. Histolojik Değerlendirme

Histopatolojik, histomorfometrik ve immunohistokimyasal değerlendirmeler Bezmialem Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında gerçekleştirildi.

** Cayman Rat Gsh-Px, Cat. No: 10009055, Cayman Chemical Inc. Michigan, USA.

†† Cayman Rat MDA, Cat. No: 706002, Cayman Chemical Inc. Michigan, USA.

‡‡ Cayman Rat SOD, Cat. No: 703102, Cayman Chemical Inc. Michigan, USA.

§§ Architect c 8000, Abbott Laboratuvarı, Illinois, USA.

3.5.1. Histopatolojik Değerlendirme

Alınan dokular %10 nötral tamponlu formalin içerisinde fikse edildi. Fiksasyon sonrası dokular 10% EDTA (pH 7.4) dekalsifikasyon solüsyonuna alınarak dekalsifiye edildi. Dekalsifikasyon sonrası dokular distile su ile yıkanıp yükselen alkol serisi ve ksilenden geçirilerek parafin içerisinde gömüldü. Mikrotom ile 5 µm kalınlıkta kesitler alındı. Alınan kesitler Hematoksilen&Eozin yöntemi ile boyanarak histopatolojik inceleme yapıldı.

Enflamasyon bulgularının değerlendirilmesinde enflamatuvar hücre skorlaması dikkate alındı. Enflamatuvar hücre skorlaması, enflamatuvar hücre infiltrasyonunun histopatolojik olarak değerlendirilmesi ve hücrelerin varlığının skorlanması ile yapıldı. Skorlama, aşağıda özetlenen kriterlere göre gerçekleştirildi (137).

Skor 0: Hücrelerin olmaması

Skor 1: Minimum düzeyde hücre olması

Skor 2: Orta düzeyde hücre olması

Skor 3: Yüksek düzeyde hücre olması

3.5.2. Histomorfometrik Değerlendirme

Alveolar kemik kaybı (AKK), mine-sement sınırı (MSS) ile alveolar kemik kreti (AKT) arasındaki mesafenin ölçülmesi ile belirlendi. MSS ile AKT arasındaki mesafe değerleri mikrometre “µm” olarak saptandı. Alveolar kemik kaybı ölçümleri ikinci azı dişin mezial, furkasyon ve distal bölgelerinde ayrı ayrı gerçekleştirildi (138). Herbir alanda yapılan ölçümler 3 noktada gerçekleştirilerek aritmetik ortalaması alındı. Elde edilen ortalama değerler mezial, furkasyon bölgesi ve distal AKK değerleri olarak kaydedildi. Hematoksilen&Eozin boyalı kesitlerdeki lineer değişiklikler ışık mikroskopu altında *** incelendi. Ölçümler “imaj” görüntü olarak kayıt altına alındı ve bilgisayar ortamında ‘Image J^{†††}’ adlı program ile standardize olarak değerlendirildi. Yapılan ölçümlere ait örnek bir kesit **Fotoğraf 4**’de gösterildi.

*** Nikon Eclipse i5, Nikon Instruments Inc, Tokyo, Japan.

††† Image J v.1.5, National Institutes of Health, Maryland, USA.



Fotoğraf 4. Alveolar kemik kaybının ölçümleri, H&E boyama, 40X büyütme, bar: 500 µm.

MSS: Mine sement sınırı, AKT: Alveolar kret tepesi, F: Furkasyon bölgesi, a: Komşu dişlerin MSS'leri arası çizgi, b: MSS ile AKT arası mesafe, c: Furkasyon ile AKT arası mesafe.

3.5.2. İmmünohistokimyasal Değerlendirme

Pozitif şarjlı lamlara alınan 5 µm kalınlıkta kesitler deparafinizasyon ve rehidratasyon işlemlerinden sonra %3'lük hidrojen peroksit ile inkübe edilerek endojen enzim blokağı yapıldı. Devamında çeşme suyu ve distile su ile yıkama yapıldıktan sonra sitrat tamponu ile mikrodalgada 200 W'ta 20 dk bekletilerek antijen geri kazanımı yapıldı. Örneklerin PBS ile yıkamasından sonra örnekler %2'lik sığır serum albümin ile 20 dk inkübe edilerek bloklandı.

Bloklamadan hemen sonra örnekler alveolar kemik metabolizmasında etkili parametreler olan RANKL^{†††} ve OPG^{§§§} birincil antikorunu ile +4°C'de bütün gece inkübe edildi. Daha sonra deteksiyon kiti^{****} kullanarak ikincil antikorun bağlanması sağlandı. PBS ile yıkama sonrası örnekler streptavidin peroksidaz ile 10 dk inkübe edilerek

††† / RANK L/TNFSF11 Antibody, NB100-56512, Novus Biological, Littleton, USA.

§§§ Osteoprotegerin/TNFRSF11B Antibody, NB100-56505, Novus Biological, Littleton, USA.

**** Histostain®-Plus 3rd Gen IHC, 859073, Thermo Fisher Scientific, USA.

3,3'-diaminobenzidine (DAB) ile kromojen boyama yapıldı. Böylece birincil antikor görünür hale getirildi.

İmmünohistokimyasal boyamalar sonrası kesitler kamera ataçmanlı^{††††} ışık mikroskobu^{‡‡‡‡} ve görüntü analiz sistemi^{§§§§} ile incelendi. Tüm kesitlerde RANKL ve OPG boyanma yoğunlukları ve boyanma alanları ölçüldü. Boyanma yoğunluğu (intensity), kesitlerden alınan görüntünün bilgisayar ortamındaki piksel yoğunluğuna göre (beyaz-siyah aralığındaki değerler) ölçüldü. Boyanma alanı ise, kesitlerdeki görüntülerde boyanan hücre alanının (μm) tüm boyanan alana (range of interest (μm)) oranı alınarak hesaplandı. Ölçümler 200X büyütmede rastgele seçilen üç bölgede bütün kesit alanında yapıldı.

3.6. İstatistiksel Analiz

Çalışmaya başlamadan önce bir gruba düşen minimum örnek sayısı Power analizi ile belirlendi. Buna göre %80 güçte, %20 kayıp oranı göz önünde bulunduruldu ve grup başına olması gereken hayvan sayısının 8 olduğu tespit edildi. Hesaplama yapılırken önceki çalışmalardaki dişeti dokusu MDA seviyeleri ($\mu\text{mol}/\text{mg}$) göz önünde bulunduruldu (Standart sapma= 0–1,5) (139-141).

Verilerin normal dağılımları Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. Buna göre normal dağılım gösteren veriler parametrik test olan *One Way ANOVA-Tukey* testi ile değerlendirildi. Normal dağılım göstermeyen veriler non-parametrik test olan *Kruskal Wallis-Mann-Whitney U* testi ile analiz edildi.

İstatistiksel analiz “Statistical Package for Social Sciences” (SPSS) 19 Paket Programı kullanılarak gerçekleştirildi ve $p < 0.05$ olan değerler anlamlı kabul edildi.

^{††††} Nikon DS-Fi1c, Nikon Instruments Inc, Tokyo, Japan.

^{‡‡‡‡} Nikon Eclipse i5, Nikon Instruments Inc, Tokyo, Japan.

^{§§§§} NIS Elements sürüm 4.0, Nikon Instruments Inc, Tokyo, Japan.

4. BULGULAR

Bu çalışmaya 32 adet erkek Albino Wistar sıçan kullanılarak başlandı ve 32 sıçan ile çalışma bitirildi. Sıçanların 16 adedinde DP oluşturmak amacıyla üst çene sağ ve sol 2. azı dişlerin servikaline ligatür bağlandı. DP başlatılmasından sakrifikasyon zamanına kadar, 14 gün boyunca ligatürlerin dişler etrafında kaldığı gözlemlendi.

4.1. Biyokimyasal Parametrelerin Değerlendirilmesi

Çalışmada sakrifikasyon gününde DP-SF grubundaki 1 adet sıçanın anestezi yapıldıktan sonra yaşamsal fonksiyonlarında düşüş gözlemlendi ve 1 dakika içinde ölüm gerçekleşti. Erken müdahaleye rağmen, kanın erken pıhtılaşması sonucu bu sıçandan kardiyak kan alınamadı. Sakrifikasyon işlemi sonrası, 31 adet (15 kontrol, 16 test) kardiyak kan örneği ve 32 adet (16 kontrol, 16 test) ligatür çevresi dişeti dokusu örneği alınarak çalışma tamamlandı.

4.1.1. Oksidatif Stres Parametrelerinin Değerlendirilmesi

4.1.1.1. Serum MDA, SOD, GSH-Px Ölçümlerinin Değerlendirilmesi

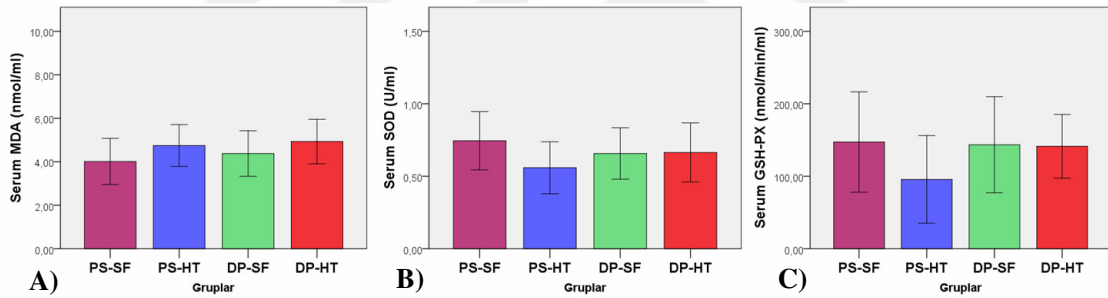
Çalışma gruplarındaki serum MDA, SOD ve GSH-Px seviyeleri **Tablo 2** ve **Figür 1A,B,C'**de özetlendi. Serum düzeylerinin gruplar arasında anlamlı olarak farklı olmadığı belirlendi ($p>0.05$).

Tablo 2. Çalışma gruplarındaki serum MDA (nmol/ml), SOD (U/ml) ve GSH-Px (nmol/min/ml) seviyeleri.

| | PS-SF (n=8) | PS-HT (n=8) | DP-SF (n=7) | DP-HT (n=8) | <i>p</i> * |
|-----------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|------------|
| MDA (nmol/ml) | | | | | |
| Ort±Ss | 4.01±0.70 | 4.42±1.08 | 4.37±0.69 | 4.54±1.26 | |
| Ortanca | 4.00 | 4.44 | 4.22 | 4.63 | 0.728 |
| Min-Maks | 3.04-5.10 | 2.18-5.53 | 3.55-5.41 | 1.84-5.78 | |
| SOD (U/ml) | | | | | |
| Ort±Ss | 0.74±0.13 | 0.55±0.11 | 0.65±0.11 | 0.60±0.22 | |
| Ortanca | 0.76 | 0.58 | 0.66 | 0.61 | 0.117 |
| Min-Maks | 0-54-0.98 | 0.41-0.71 | 0.47-0.81 | 0.15-0.86 | |
| GSH-PX (nmol/min/ml) | | | | | |
| Ort±Ss | 147.25±46.19 | 114.12±64.22 | 143.50±44.25 | 160.37±60.23 | |
| Ortanca | 166.00 | 101.00 | 128.50 | 151.00 | 0.401 |
| Min-Maks | 63.50-198.50 | 33.50-243.50 | 93.50-203.50 | 93.50-293.50 | |

*One Way ANOVA testine göre anlamlılık,

PS-SF: Periodontal Olarak Sağlıklı Serum Fizyolojik, PS-HT: Periodontal Olarak Sağlıklı Hidroksitirozol, DP-SF: Deneysel Periodontitisli Serum Fizyolojik, DP-HT: Deneysel Periodontitisli Hidroksitirozol, MDA: Malondialdehit, SOD: Süperoksit Dismutaz, GSH-Px: Glutasyon Peroksidaz, Ort: Ortalama, Ss: Standart Sapma, Min-Maks: Minimum-maksimum, $p < 0.05$: İstatiksel olarak anlamlılık)



Figür 1. Çalışma gruplarındaki serum MDA (nmol/ml), SOD (U/ml) ve GSH-Px (nmol/min/ml) seviyeleri

PS-SF: Periodontal Olarak Sağlıklı Serum Fizyolojik, PS-HT: Periodontal Olarak Sağlıklı Hidroksitirozol, DP-SF: Deneysel Periodontitisli Serum Fizyolojik, DP-HT: Deneysel Periodontitisli Hidroksitirozol, MDA: Malondialdehit, SOD: Süperoksit Dismutaz, GSH-Px: Glutasyon Peroksidaz. Veriler ortalama ve standart hata olarak verilmiştir.

4.1.1.2. Doku MDA, SOD, GSH-Px Ölçümlerinin Değerlendirilmesi

Doku MDA, SOD ve GSH-Px düzeylerinin gruplara göre dağılımı **Tablo 3**'de verildi. Buna göre DP oluşturulan gruplarda dişeti dokusu MDA düzeyleri PS kontrollerine göre yüksek olmakla beraber bu sonuç istatistiksel olarak farklı değildi ($p > 0.05$). DP-HT grubu dişeti dokusu MDA düzeylerinin DP-SF grubuna göre daha düşük seviyede olduğu ancak bu sonucun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p > 0.05$) (**Figür 2A**).

Dişeti SOD seviyeleri gruplar arasında değerlendirildiğinde ise, DP oluşturulan gruplardaki dişeti SOD seviyelerinin PS-HT grubuna göre istatistiksel olarak daha düşük olduğu ($p<0.05$), diğer taraftan HT uygulaması yapılan DP grubunda artış gösterdiği ancak bu durumun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p>0.05$) (**Figür 2B**).

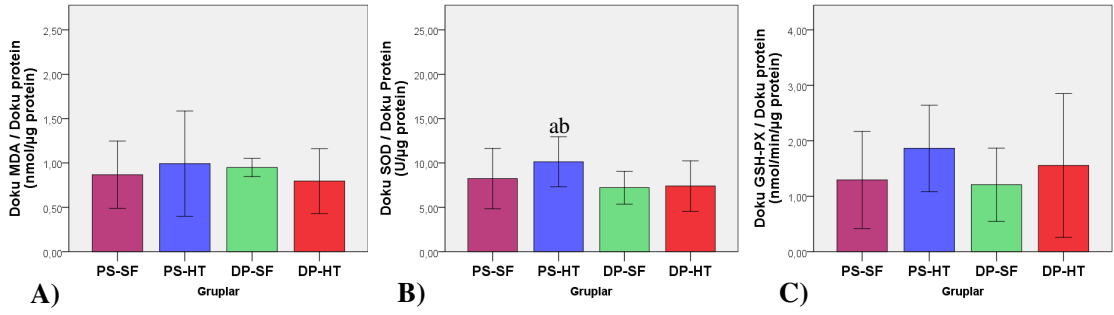
Dişeti dokusu GSH-Px düzeyleri değerlendirildiğinde ise HT uygulamasının doku düzeylerini artırdığı ancak bu sonucun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi ($p>0.05$) (**Figür 2C**).

Tablo 3. Çalışma gruplarındaki doku MDA (nmol/ml), SOD (U/ml) ve GSH-Px (nmol/min/ml) seviyeleri.

| | PS-SF (n=8) | PS-HT (n=8) | DP-SF (n=8) | DP-HT (n=8) | p^* |
|----------------------------------|----------------|---------------------------|----------------|----------------|-------|
| Doku MDA (nmol/ml) | | | | | |
| Ort±Ss | 0.86±0.45 | 0.99±0.70 | 0.94±0.12 | 0.79±0.43 | 0.848 |
| Ortanca | 0.70 | 0.80 | 0.93 | 0.79 | |
| Min-Maks | 0.45-1.75 | 0.40-2.41 | 0.79-1.16 | 0.25-1.46 | |
| Doku SOD (U/ml) | | | | | |
| Ort±Ss | 8.23±2.26 | 10.12±1.87 ^{a,b} | 7.21±1.23 | 7.39±1.89 | 0.015 |
| Ortanca | 7.23 | 9.46 | 6.94 | 7.41 | |
| Min-Maks | 5.81-12.29 | 8.19-13.83 | 6.24-9.35 | 5.20-10.93 | |
| Doku GSH-PX (nmol/min/ml) | | | | | |
| Ort±Ss | 1.29±0.58 | 1.86±0.51 | 1.20±0.44 | 1.55±0.86 | 0.170 |
| Ortanca | 1.39 | 1.79 | 1.19 | 1.38 | |
| Min-Maks | 0.35-2.19 | 1.23-2.22 | 0.80-1.96 | 0.42-3.07 | |

*One Way ANOVA testine göre anlamlılık,

PS-SF: Periodontal Olarak Sağlıklı Serum Fizyolojik, PS-HT: Periodontal Olarak Sağlıklı Hidroksitirozol, DP-SF: Deneysel Periodontitisli Serum Fizyolojik, DP-HT: Deneysel Periodontitisli Hidroksitirozol, MDA: Malondialdehit, SOD: Süperoksit Dismutaz, GSH-Px: Glutasyon Peroksidaz, Ort: Ortalama, Ss: Standart Sapma, Min-Maks: Minimum-maksimum, $p<0.05$: İstatistiksel olarak anlamlılık, a: DP-SF'ye göre farklılık, b: DP-HT'ye göre farklılık.



Figür 2. Doku MDA (nmol/ml), SOD (U/ml) ve GSH-Px (nmol/min/ml) ölçümlerinin gruplara göre değişimleri.

a: DP-SF'ye göre farklılık, b: DP-HT'ye göre farklılık.

PS-SF: Periodontal Olarak Sağlıklı Serum Fizyolojik, PS-HT: Periodontal Olarak Sağlıklı Hidroksitirozol, DP-SF: Deneysel Periodontitisli Serum Fizyolojik, DP-HT: Deneysel Periodontitisli Hidroksitirozol, MDA: Malondialdehit, SOD: Süperoksit Dismutaz, GSH-Px: Glutasyon Peroksidaz. Veriler ortalama ve standart hata olarak verilmiştir.

4.1.2. Toksikite Değerlendirmesi

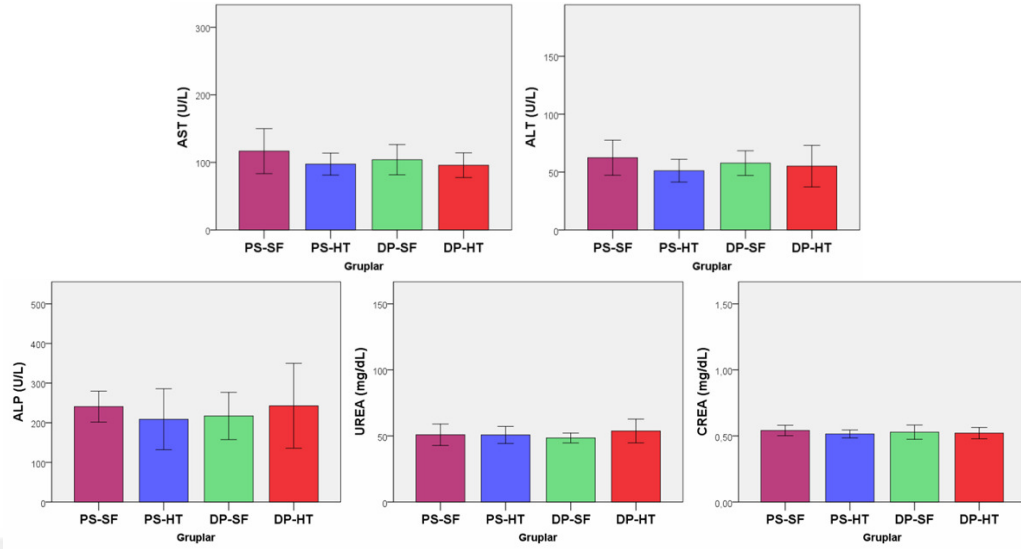
Bu çalışmada sistemik toksisitenin değerlendirilmesi amacıyla karaciğer ve böbrek enzimleri olan GGT, AST, ALT, ALP, UREA ve CREA'nın serum düzeyleri ölçüldü (**Tablo 4**). Karaciğer toksisitesinin göstergesi olan GGT'nin tüm gruplarda toksik değerin çok altında bir değer (<4 U/L) olmasından dolayı tabloda verilmedi. Enzim düzeylerinin toksik değerin altında olduğu (142-146) ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p>0.05$) (**Figür 3**).

Tablo 4. Çalışma gruplarındaki serum AST (U/L), ALT (U/L), ALP (U/L), UREA (mg/dL) ve CREA (mg/dL) seviyeleri.

| | PS-SF (n=8) | PS-HT (n=8) | DP-SF (n=7) | DP-HT (n=8) | <i>p</i> * |
|---------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------|
| Serum AST (U/L) | | | | | |
| Ort±Ss | 129.50±41.57 | 97.50±10.90 | 104±14.92 | 95.87±12.19 | 0.610 |
| Ortanca | 109.00 | 96.00 | 103.00 | 93.00 | |
| Min-Maks | 98.0-219.0 | 83.0-114.0 | 81.0-128.0 | 84.0-120.0 | |
| Serum ALT (U/L) | | | | | |
| Ort±Ss | 62.37±10.08 | 51.12±6.53 | 57.71±7.11 | 55.12±11.95 | 0.445 |
| Ortanca | 61,50 | 52,50 | 60.00 | 58.00 | |
| Min-Maks | 48.0-78.0 | 41.0-59.0 | 48.0-67.0 | 29.0-67.0 | |
| Serum ALP (U/L) | | | | | |
| Ort±Ss | 240.62±26.04 | 208.75±51.28 | 217±39.77 | 242.75±71.39 | 0.128 |
| Ortanca | 238.50 | 206.00 | 201.00 | 258.00 | |
| Min-Maks | 206.0-288.0 | 110.0-282.0 | 173.0-283.0 | 116.0-332.0 | |
| Serum UREA (mg/dL) | | | | | |
| Ort±Ss | 50.87±5.43 | 50.75±4.30 | 48.42±2.50 | 53.75±5.99 | 0.329 |
| Ortanca | (43-58) | (43-58) | (45-51) | (45-60) | |
| Min-Maks | 43.0-58.0 | 43.0-58.0 | 45.0-51.0 | 45.0-60.0 | |
| Serum CREA (mg/dL) | | | | | |
| Ort±Ss | 0.54±0.02 | 0.51±0.02 | 0.52±0.03 | 0.52±0.02 | 0.294 |
| Ortanca | 0.54 | 0.51 | 0.52 | 0.52 | |
| Min-Maks | 0.51-0.59 | 0.49-0.55 | 0.50-0.60 | 0.48-0.56 | |

**One Way ANOVA* testine göre anlamlılık,

PS-SF: Periodontal Olarak Sağlıklı Serum Fizyolojik, PS-HT: Periodontal Olarak Sağlıklı Hidroksitirozol, DP-SF: Deneysel Periodontitisli Serum Fizyolojik, DP-HT: Deneysel Periodontitisli Hidroksitirozol, AST: Aspartat Transaminaz, ALT: Alanin Aminotransferaz, ALP: Alkalen Fosfataz, UREA: Kan Üre Azotu, CREA: Kreatin, Ort: Ortalama, Ss: Standart Sapma, Min-Maks: Minimum-maksimum, $p>0.05$: İstatiksel olarak anlamlılık.



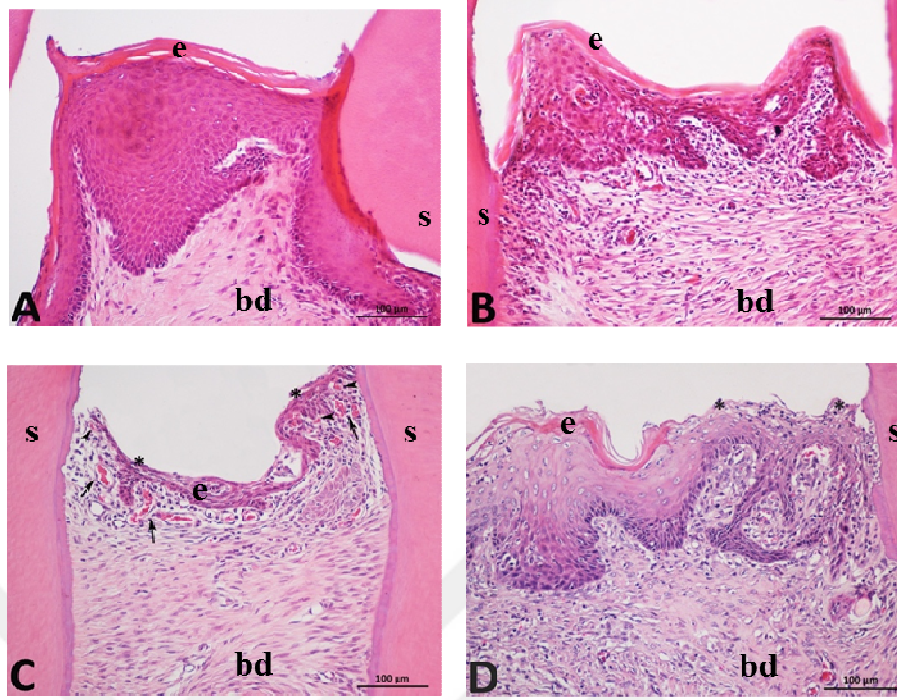
Figür 3. Serum GGT (U/L), AST (U/L), ALT (U/L), ALP (U/L), UREA (mg/dL) ve CREA (mg/dL) ölçümlerinin gruplara göre değişimleri.

PS-SF: Periodontal Olarak Sağlıklı Serum Fizyolojik, PS-HT: Periodontal Olarak Sağlıklı Hidroksitirozol, DP-SF: Deneysel Periodontitisli Serum Fizyolojik, DP-HT: Deneysel Periodontitisli Hidroksitirozol, GGT: Gamma Glutamil Transferaz, AST: Aspartat Transaminaz, ALT: Alanin Aminotransferaz, ALP: Alkalin Fosfataz, UREA: Kan Üre Azotu, CREA: Kreatin, U/L: birim/litre, mg/dL: milligram/desilitre. *Veriler ortalama ve standart hata olarak verilmiştir.*

4.3. Histolojik Parametrelerin Değerlendirilmesi

4.3.1. Histopatolojik Değerlendirme

PS-SF ve PS-HT gruplarında normal morfolojide çok katlı keratinize epitel dokusu ve bağ dokusu gözlemlendi (**Fotoğraf 5. A, B**). DP-SF grubunda ise keratin tabaka ve yüzey hücre kayıplarına bağlı olarak epitel doku hasarı izlendi. Buna ilaveten epitel altında bağ dokusunda damarlanma ve hafif derecede enflamasyon görüldü (**Fotoğraf 5. C**). DP-HT grubunda epitel dokuda hasarın azalması ile çok katlı hücre görünümü olmasına rağmen yer yer keratin tabakada dökülmeler gözlemlendi (**Fotoğraf 5. D**).



Fotoğraf 5. Histopatolojik kesitler (H&E boyama, 200X büyütme, bar: 100 µm).

A. PS-SF: Periodontal Olarak Sağlıklı Serum Fizyolojik **B.** PS-HT: Periodontal Olarak Sağlıklı Hidroksitirozol **C.** DP-SF: Deneysel Periodontitisli Serum Fizyolojik **D.** DP-HT: Deneysel Periodontitisli Hidroksitirozol. **e:** Epitel, **bd:** Bağ dokusu, **s:** Sementum.

PS-SF (A) ve PS-HT (B) gruplarında normal morfolojide epitel ve bağ dokusu. DP-SF grubunda keratin tabakası ve yüzey epiteli hücrelerinde dökülme (*), damarlanma (→) ve hafif şiddette enflamasyon (▷) (C). DP-HT grubunda keratin tabakası ve yüzey epitelinde yer yer dökülme (*) (D). H&E boyama, 200X büyütme, bar: 100 µm.

4.3.2. Histomorfometrik Değerlendirme

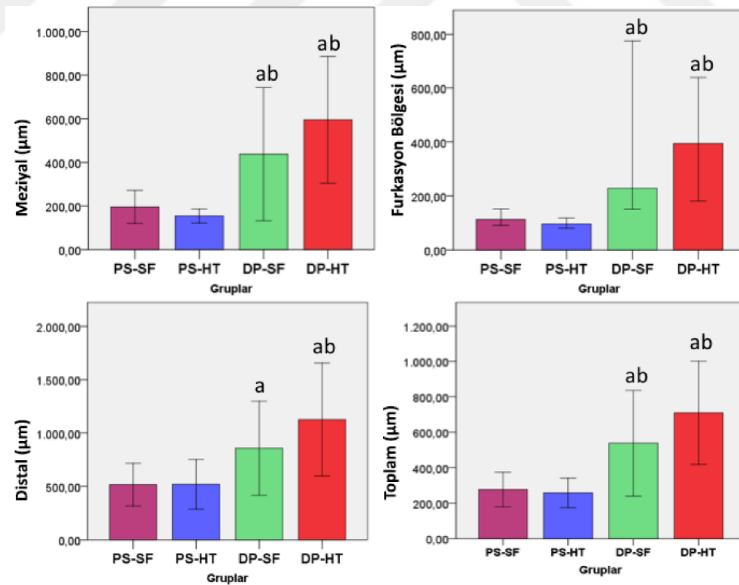
Bu çalışmada ikinci azı dişi çevresi alveolar kemik kayıplarının değerlendirilmesi amacıyla MSS ile AKT arasındaki mesafe değerleri incelenmiştir. Çalışma gruplarındaki kemik kayıp düzeyleri **Tablo 5**'de özetlendi. DP gruplarındaki alveolar kemik kayıpları ölçümleri PS gruplarından istatistiksel olarak anlamlı yüksek olduğu tespit edildi ($p < 0.05$). Diğer taraftan deneysel periodontitis oluşturulan gruplar (DP-SF ve DP-HT) arasında istatistiksel olarak anlam farklılık olmadığı belirlendi ($p > 0.05$) (**Figür 4**).

Tablo 5. Çalışma gruplarındaki Kemik Kaybı Değerleri (µm).

| | PS-SF (n=8) | PS-HT (n=8) | DP-SF (n=8) | DP-HT (n=8) | p |
|-------------------------------|----------------|----------------|------------------------------|-------------------------------|---------|
| Meziyal (µm) | | | | | |
| Ort±Ss | 195.63±50.40 | 154.16±21.34 | 437.68±203.49 ^{a,b} | 595.23±193.66 ^{a,b} | |
| Ortanca | 191.79 | 160.37 | 371.19 | 563.22 | 0.000* |
| Min-Maks | 122.52-302.92 | 120.02-181.24 | 249.89-767.41 | 358.97-894.36 | |
| Furkasyon Bölgesi (µm) | | | | | |
| Ort±Ss | 117.78±23,37 | 98.35±12.30 | 318.66±211.54 ^{a,b} | 406.99±183.97 ^{a,b} | |
| Ortanca | 113.45 | 96.98 | 228.83 | 394.05 | 0.000** |
| Min-Maks | 91.73-152.06 | 80.86-118.75 | 151.19-775.31 | 181.14-639.24 | |
| Distal (µm) | | | | | |
| Ort±Ss | 516.01±132.74 | 519.48±154.27 | 856.59±293.52 ^a | 1124.76±352.79 ^{a,b} | |
| Ortanca | 486.00 | 491.71 | 854.84 | 1036.42 | 0.000* |
| Min-Maks | 358.62-762.59 | 288.30-754.36 | 524.98-1312.39 | 755,02-1858,73 | |
| Toplam (µm) | | | | | |
| Ort±Ss | 276.47±65.05 | 257.33±55.45 | 537.64±198.86 ^{a,b} | 708.99±194.52 ^{a,b} | |
| Ortanca | 270.57 | 242.70 | 497.53 | 678.96 | 0.000* |
| Min-Maks | 193-48-405.86 | 183.08-351.45 | 324.87-868.62 | 464.10-1086.02 | |

*One Way ANOVA testine göre anlamlılık, **Kruskal Wallis testine göre anlamlılık

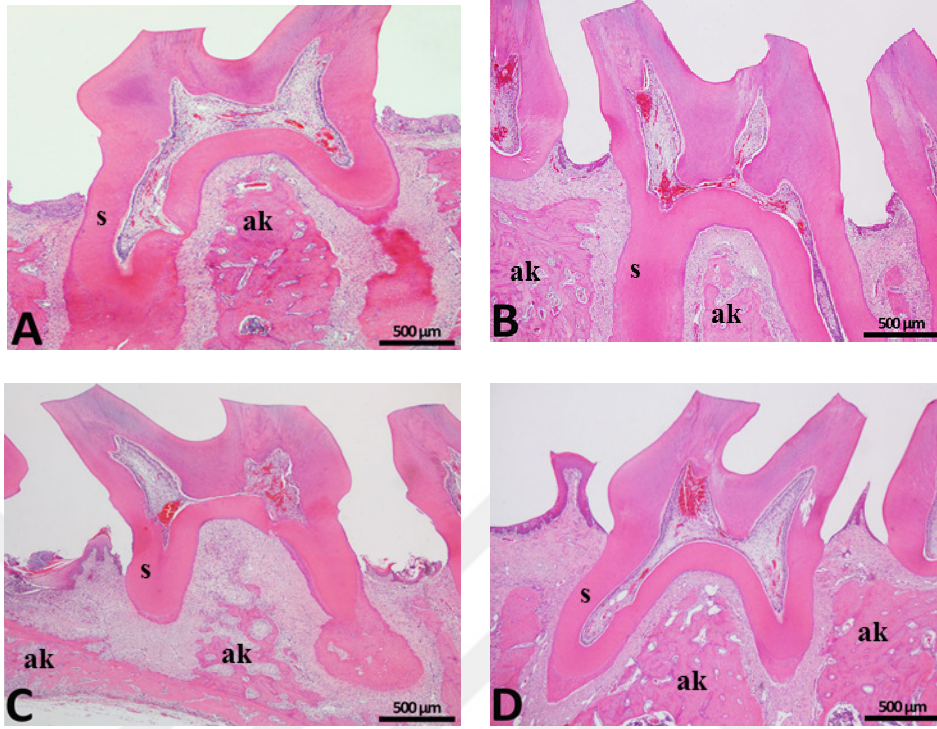
PS-SF: Periodontal Olarak Sağlıklı Serum Fizyolojik, PS-HT: Periodontal Olarak Sağlıklı Hidroksitirozol, DP-SF: Deneysel Periodontitisli Serum Fizyolojik, DP-HT: Deneysel Periodontitisli Hidroksitirozol, µm: mikrometre, Ort: Ortalama, Ss: Standart Sapma, Min-Maks: Minimum-maksimum, $p < 0.05$: İstatiksel olarak anlamlılık, a: PS-SF'ye göre farklılık, b: PS-HT'ye göre farklılık.

**Figür 4. Kemik Kaybı ölçümlerinin gruplara göre değişimleri.**

a: PS-SF'ye göre farklılık, b: PS-HT'ye göre farklılık.

PS-SF: Periodontal Olarak Sağlıklı Serum Fizyolojik, PS-HT: Periodontal Olarak Sağlıklı Hidroksitirozol, DP-SF: Deneysel Periodontitisli Serum Fizyolojik, DP-HT: Deneysel Periodontitisli Hidroksitirozol, µm: mikrometre. Veriler ortalama ve standart hata olarak verilmiştir.

Deney gruplarına ait Hematoksilen&Eozin boyamaları **Fotoğraf 6**'da verildi.



Fotoğraf 6. Gruplara göre alveolar kemik kayıpları, H&E boyama, 40X büyütme, bar: 500 µm.

A. PS-SF: Periodontal Olarak Sağlıklı Serum Fizyolojik **B.** PS-HT: Periodontal Olarak Sağlıklı Hidroksitirozol **C.** DP-SF: Deneysel Periodontitisli Serum Fizyolojik **D.** DP-HT: Deneysel Periodontitisli Hidroksitirozol. **ak:** Alveolar kret, **s:** Sementum.

4.3.3. İmmünohistokimyasal Değerlendirme

Sıçanlarda elde edilen 32 sert doku örneğinin 2 tanesinden elde edilen kesitlerde RANKL boyanması, kesitlerin dökülmesi ve katlanması nedeniyle yapılamamıştır.

4.3.3.1. RANKL, OPG ve RANKL/OPG Ölçümlerinin Değerlendirilmesi

Çalışmada değerlendirilen RANKL ve OPG boyanma alanı ve boyanma yoğunluğu seviyeleri **Tablo 6**'da gösterildi. RANKL boyanma alanı ölçümleri DP-HT grubunda DP-SF grubuna göre istatistiksel olarak daha az olduğu belirlendi ($p < 0.05$) (**Figür 5A**). OPG boyanma alanı seviyeleri değerlendirildiğinde bu düzeylerin, DP-SF grubunda PS-SF grubuna göre beklenildiği gibi daha az olduğu ancak bu durumun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı ($p > 0.05$) (**Figür 5B**). RANKL/OPG boyanma alanı oranı PS-SF grubunda PS-HT ve DP-HT gruplarına göre anlamlı derecede yüksekti ($p < 0.05$) (**Figür 5C**).

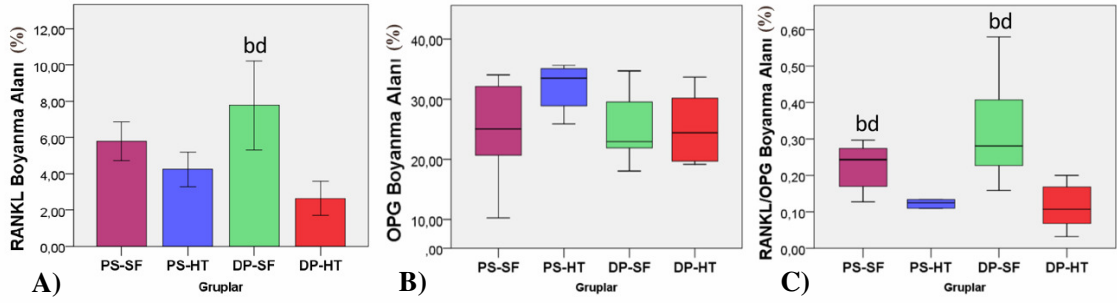
DP-HT grubu RANKL boyanma yoğunluğu değeri PS-SF grubundan anlamlı az olduğu belirlendi ($p<0.05$). DP-SF grubu RANKL boyanma yoğunluğu seviyelerinin PS-HT grubundan anlamlı derecede daha yüksek olduğu ($p<0.05$), DP-HT grubu RANKL boyanma yoğunluğu ölçümlerinin DP-SF grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede az olduğu tespit edildi ($p<0.05$) (**Figür 6A**). PS-SF grubu OPG boyanma yoğunluğu seviyeleri DP-SF ve DP-HT gruplarından anlamlı daha yüksek olduğu belirlendi ($p<0.05$). PS-HT grubunun OPG boyanma yoğunluğu değerleri DP-SF ve DP-HT gruplarından anlamlı derecede fazla olduğu belirlendi ($p<0.05$) (**Figür 6B**). DP-SF grubu RANKL/OPG boyanma yoğunluğunun PS-SF, PS-HT ve DP-HT gruplarından daha yüksek olduğu tespit edildi ($p<0.05$) (**Figür 6C**).

Tablo 6. Çalışma gruplarındaki RANKL, OPG, RANKL/OPG boyanma alanı yüzdeleri ve boyanma yoğunluğu ölçümleri.

| | PS-SF (n=7) | PS-HT (n=7) | DP-SF (n=8) | DP-HT (n=8) | <i>p</i> |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------|----------------|
| Boyanma Alanı (%) | | | | | |
| RANKL | | | | | |
| Ort±Ss | 5.79±1.15 | 4.24±1.02 | 7.76±2.94 ^{b,d} | 2.65±1.11 | 0.000* |
| Ortanca | 6.11 | 3.95 | 6.82 | 2.95 | |
| Min-Maks | 4,11-7,65 | 3.19-6.38 | 3.68-13.15 | 0.93-4.04 | |
| OPG | | | | | |
| Ort±Ss | 24.99±7.92 | 34.61±9.72 | 25.19±5.93 | 22.67±5.97 | 0.084** |
| Ortanca | 25.05 | 33.48 | 22.94 | 24.41 | |
| Min-Maks | 10.24-34.02 | 25.89-54.92 | 18.05-34.70 | 19.17-33.66 | |
| RANKL/OPG | | | | | |
| Ort±Ss | 0.26±0.16 ^{b,d} | 0.12±0.03 | 0.32±0.14 ^{b,d} | 0.11±0.06 | 0.010** |
| Ortanca | 0.24 | 0.12 | 0.28 | 0.10 | |
| Min-Maks | 0.12-0.62 | 0.06-0.18 | 0.15-0.58 | 0.03-0.20 | |
| Boyanma Yoğunluğu | | | | | |
| RANKL | | | | | |
| Ort±Ss | 66.80±9.96 ^d | 54.52±9.02 | 77.75±8.84 ^{b,d} | 52.41±12.34 | 0.010** |
| Ortanca | 63.66 | 56.33 | 82.5 | 54.5 | |
| Min-Maks | 54.66-82.00 | 36.00-62.33 | 60.66-85.00 | 32.00-68.33 | |
| OPG | | | | | |
| Ort±Ss | 93.04±9.59 ^{c,d} | 92.76±8.68 ^{c,d} | 65.37±8.03 | 75.19±8.48 | 0.000* |
| Ortanca | 92.00 | 91.66 | 66.83 | 73.00 | |
| Min-Maks | 79.33-109.66 | 82.00-104.33 | 49.33-73.66 | 64.66-91.66 | |
| RANKL/OPG | | | | | |
| Ort±Ss | 0.73±0.16 | 0.57±0.09 | 1.20±0.17 ^{a,b,d} | 0.69±0.13 | 0.000* |
| Ortanca | 0.75 | 0.58 | 1.16 | 0.76 | |
| Min-Maks | 0.54-1.03 | 0.42-0.71 | 0.96-1.48 | 0.45-0.82 | |

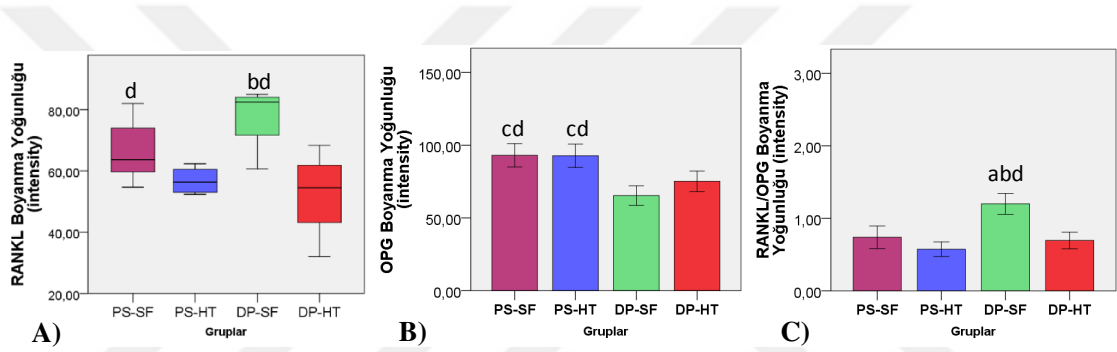
*One Way ANOVA testine göre anlamlılık, **Kruskal Wallis testine göre anlamlılık

PS-SF: Periodontal Olarak Sağlıklı Serum Fizyolojik, PS-HT: Periodontal Olarak Sağlıklı Hidroksitirozol, DP-SF: Deneysel Periodontitisli Serum Fizyolojik, DP-HT: Deneysel Periodontitisli Hidroksitirozol, RANKL: Reseptör aktivator Nükleer Kappa-B, OPG: Osteoprotegerin, BA: Boyanma Alanı, BY: Boyanma Yoğunluğu, Ort: Ortalama, Ss: Standart Sapma, Min-Maks: Minimum-maksimum, $p<0.05$: İstatistiksel olarak anlamlılık, a: PS-SF'ye göre farklılık, b: PS-HT'ye göre farklılık, c: DP-SF'ye göre farklılık, d: DP-HT'ye göre farklılık.



Figür 5. RANKL, OPG ve RANKL/OPG boyanma alanı yüzdelерinin gruplara göre değışimleri.

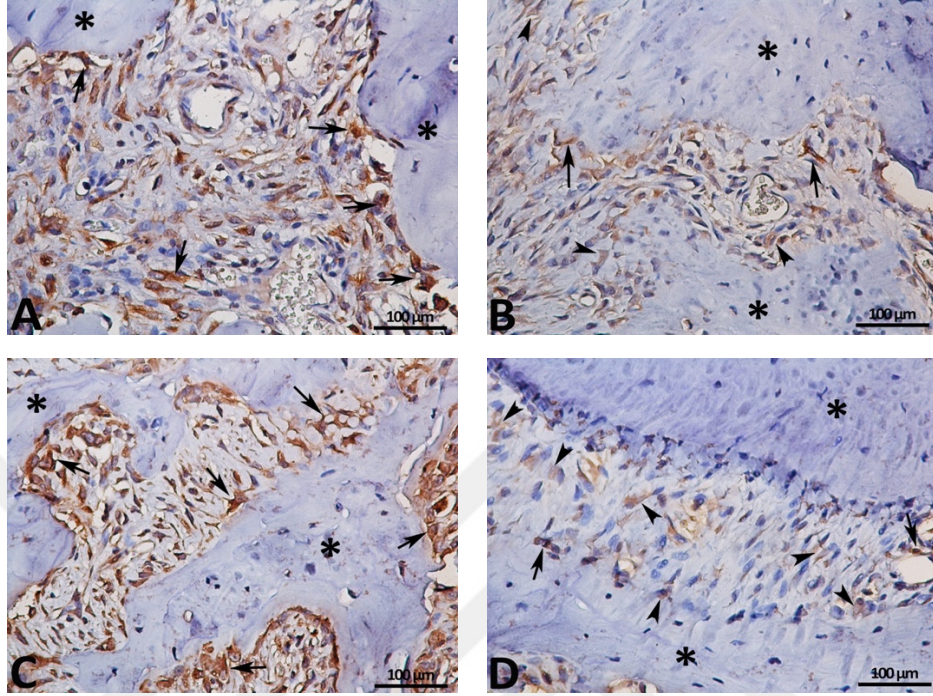
a: PS-SF'ye göre farklılık, b: PS-HT'ye göre farklılık, c: DP-SF'ye göre farklılık, d: DP-HT'ye göre farklılık. PS-SF: Periodontal Olarak Sağlıklı Serum Fizyolojik, PS-HT: Periodontal Olarak Sağlıklı Hidroksitirozol, DP-SF: Deneysel Periodontitisli Serum Fizyolojik, DP-HT: Deneysel Periodontitisli Hidroksitirozol, RANKL: Reseptör aktivator Nükleer Kappa-B, OPG: Osteoprotegerin. Veriler ortalama ve standart hata olarak verilmiştir.



Figür 6. RANKL, OPG ve RANKL/OPG boyanma yoğunluğu ölçümlerinin gruplara göre değışimleri.

a: PS-SF'ye göre farklılık, b: PS-HT'ye göre farklılık, c: DP-SF'ye göre farklılık, d: DP-HT'ye göre farklılık. PS-SF: Periodontal Olarak Sağlıklı Serum Fizyolojik, PS-HT: Periodontal Olarak Sağlıklı Hidroksitirozol, DP-SF: Deneysel Periodontitisli Serum Fizyolojik, DP-HT: Deneysel Periodontitisli Hidroksitirozol, RANKL: Reseptör aktivator Nükleer Kappa-B, OPG: Osteoprotegerin. Veriler ortalama ve standart hata olarak verilmiştir.

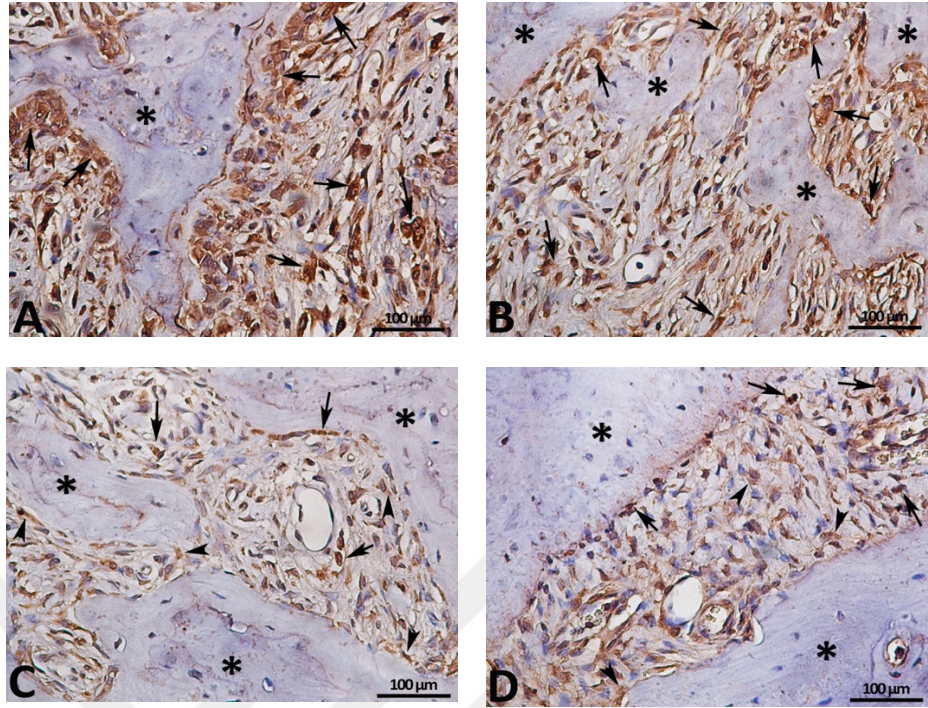
RANKL ve OPG boyamalarına ait kesitler **Fotoğraf 7 ve 8**'de verildi.



Fotoğraf 7. Gruplara göre RANKL immün boyamasına ait histolojik kesitler. 200X büyütme, bar: 100 µm.

A. PS-SF: Periodontal Olarak Sağlıklı Serum Fizyolojik **B.** PS-HT: Periodontal Olarak Sağlıklı Hidroksitirozol **C.** DP-SF: Deneysel Periodontitisli Serum Fizyolojik **D.** DP-HT: Deneysel Periodontitisli Hidroksitirozol.

A: PS-SF grubundaki yaygın şiddetli immünpozitif boyanmış hücreler (→). **B:** PS-HT grubundaki az sayıda şiddetli immünpozitif boyanmış hücreler (→) ve zayıf immünpozitif boyanmış hücreler (↗). **C:** DP-SF grubundaki çok sayıda şiddetli immünpozitif boyanmış hücreler (→). **D:** DP-HT grubundaki çok az sayıda şiddetli immünpozitif boyanmış hücreler (→) ve zayıf immünpozitif boyanmış hücreler (↗) izlenmektedir. Alveolar kemik (*), 200X büyütme, bar: 100 µm.



Fotoğraf 8. Gruplara göre OPG immün boyamasına ait histolojik kesitler. 200X büyütme, bar: 100 µm.

A. PS-SF: Periodontal Olarak Sağlıklı Serum Fizyolojik **B.** PS-HT: Periodontal Olarak Sağlıklı Hidroksitirozol **C.** DP-SF: Deneysel Periodontitisli Serum Fizyolojik **D.** DP-HT: Deneysel Periodontitisli Hidroksitirozol.

A: PS-SF grubundaki yaygın şiddetli immünpozitif boyanmış hücreler (→). **B:** PS-HT grubundaki yaygın şiddetli immünpozitif boyanmış hücreler (→). **C:** DP-SF grubunda az sayıda şiddetli immünpozitif boyanmış hücreler (→) ve yaygın zayıf immünpozitif boyanmış hücreler (↗). **D:** DP-HT grubundaki az sayıda şiddetli immünpozitif boyanmış hücreler (→) ve zayıf immünpozitif boyanmış hücreler (↗). Alveolar kemik (*), 200X büyütme, bar: 100 µm.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada DP oluşturulan sıçanlarda sistemik HT uygulamasının alveolar kemik yıkımına ve oksidatif stres parametrelerine olan etkisi değerlendirilmiştir. HT'nin periodontal hastalıkta dental plağın indüklediği enflamasyonu azaltacağı ve alveolar kemik kaybını engelleyebileceği hipotezi desteklenmemiştir. Bilgilerimiz dahilinde bu çalışma sistemik HT uygulamasının DP oluşturulan sıçanlarda periodontal kayıp üzerine etkisini değerlendiren ilk araştırmadır.

Çalışma DP modeli oluşturulan sıçanlar üzerinde yapıldı. Literatürde DP modelleri için primatların, tavşanların, mini domuzların, köpeklerin, fareler ve sıçanlar gibi kemirgenlerin kullanıldığı bilinmektedir. Bununla birlikte DP modelinde en yaygın olarak sıçanlar ve fareler kullanılmaktadır (147). Kemirgen bir tür olan sıçanların azı dişleri insanların azı dişleri ile anatomik ve morfolojik olarak benzerdir (147). Sıçanların immünolojik ve mikrobiyolojik özelliklerinin yanı sıra periodontal dokularının histolojisi de insanlara benzerlik gösterir. Bu benzerlikler sayesinde biyomateryal kullanımında ve periodontal hastalık etiyojisini değerlendirmede kolaylık sağlar. Diğer deney hayvanlarıyla kıyaslanınca kolay ve ucuz temin edilebilir olması da avantajdır. Bu özelliklerinden dolayı DP oluşturulmasında sıçanların kullanılmaları gündeme gelmiştir (148,149). Sıçanların avantajlarının yanında, doğal olarak periodontitise dirençli olması, doku analizi için çok küçük boyutta olması, herhangi bir periodontal tedavi uygulamanın zorluğu da dezavantajları olarak gösterilmiştir (147). Çalışmamızda 8-12 haftalık 32 adet erkek Albino Wistar erkek sıçan kullanıldı.

Literatür değerlendirildiğinde DP'in farklı şekillerde oluşturulduğu tespit edilmiştir. Bunlar; cerrahi işlemle defekt oluşturulması (150), gavaj uygulaması (151,152), dişetine lipopolisakkarit enjeksiyonu (153) ve azı dişlerinin etrafına ipek sütür (ligatür) bağlanmasıdır (154). Sütür bağlanarak oluşturulan DP modelinde dentogingival alanda doku travması oluşarak doku bütünlüğünün azalması ve yoğun konak-plak etkileşimine sebep olunur. Devamında mikrobiyal birikimin artması ile hızlı

bir yıkım oluşur. Akut enflamasyon zaman içinde kronik enflamasyona dönüşür (19,85). Bu nedenlerle ligatür uygulaması, plak birikimi ile indüklenen periodontal hastalığın doğal tabiatına uygun olduğu düşünüldüğünden (18,85,155-161) bu çalışmada DP modeli sıçanların 2. azı dişleri etrafına 3/0 ipek sütür bağlanması ile oluşturuldu. Yüzey yapısından dolayı ipek sütürün kalınlaşması plak birikimini artıracaktır ancak çok kalın olması da ligatür bağlanmasını zorlaştıracaktır. Bu sebeple bu çalışmada çoğunlukla tercih edilen 3/0 kalınlığı (162,163) tercih edildi.

Literatür incelendiğinde DP modelinin sıçanların alt veya üst çenelerinde (155,156,158,160) oluşturulduğu, ligatürlerin ise sıçanların farklı azı dişleri etrafına uygulandığı tespit edilmiştir (155-161). Yoğun spongios yapıya sahip olan üst çenede kemik yıkımının daha hızlı meydana geldiği rapor edilmiştir (164). İlave olarak üst çene çalışabilirlik açısından uygulayıcı için yaklaşım kolaylığı sağlamaktadır (133). Çalışmamızda DP oluşturma prosedürü Xianxian L. Ve ark. (165)'nin yaptığı DP modeli ile benzer olarak üst çene 2. azı dişlerinin servikallerine ligatür bağlanarak oluşturuldu.

Deneysel Periodontitis modelinin farklı çalışmalarda farklı zaman dilimlerinde oluşturulduğu tespit edilmiştir (85,156,166,167). Örneğin sıçanlarda 7 (166), 11 (163), 14 (123), 21 (162) ve 60 gün (164) gibi farklı süre zarflarında ligatürle indüklenen DP modeli oluşturulmuş ve alveoler kemik kaybı değerlendirilmiştir. Kuhr ve ark (156) sıçanların üst 2. azı dişlerine ligatür bağlamış ve sakrifikasyon sonrası 1., 15., 30. ve 60. günlerde çene örneklerinden aldıkları kesitlerde morfometrik olarak alveoler kemik kaybını değerlendirmişlerdir. Çalışma sonunda en fazla kemik kaybının ilk 15 günlük zaman aralığında meydana geldiğini, 30. ve 60. günlerdeki kemik kaybının ise hafif bir artış şeklinde devam ettiğini saptamışlardır (156). Bu bilgiler ışığında bu çalışmada DP modeli 2 hafta süre zarfında oluşturuldu.

Birçok laboratuvar ve klinik çalışmalarda yumuşak ve sert doku metabolizması üzerinde yeni yaklaşımlar geliştirilmek amacıyla çeşitli bitki özütleri, antioksidanlar ve vitaminler kullanılmıştır (23). Literatüre bakıldığında periodontal doku yıkımında thymoquinone (21), koenzim Q (168), galik asit (169), mangiferin (170), resveratrol

(22), verbascoside (20), flavonoidler (17) ve melatonin (24) gibi farklı antioksidanların kullanıldığı ve bunların periodontal hastalıktaki rollerini değerlendiren çalışmaların bulunduğu tespit edilmiştir (17-24). Periodontal hastalıkta antioksidanların uygulanması ile proenflamatuvar sitokinlerin düzenlendiği (14,16) ve antioksidanların yumuşak ve sert doku kaybını azaltarak doku tamirini artırabileceği rapor edilmiştir (23).

Hidroksitirozol Akdeniz diyetinin zengin içeriğini oluşturan zeytinyağının fenolik bir bileşimidir. Antiinflamatuvar ve antioksidan etkileri ile akut ve kronik pek çok hastalığa karşı yararlı ve koruyucu özelliklerinin olduğu tespit edilmiştir (100). Örneğin HT'nin kardiyovasküler hastalıkların önlenmesinde rol oynadığı (25), endotel hücrelerdeki anti-oksidan savunma sistemini düzenlediği (27), DNA hasarını ve tümör hücre proliferasyonunu engellediği (26), romatoid artritte ödemi ve doku yıkımını azalttığı (112) ve diyabetik nöropatiyi düzenleyebileceği (99) rapor edilmiştir. İlave olarak HT'nin IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α gibi proenflamatuvar sitokinleri ve prostaglandin E2 üretimini azalttığı, ayrıca NO sentezini de düzenlediği bildirilmiştir (123,124). Bullon ve ark. tavşanlarda ateroskleroz oluşturmuş ve ateroskleroz nedeniyle dişeti dokusunda meydana gelen hasarın HT uygulaması ile geri dönüşümlü olduğu tespit edilmiştir (131). Yine sıçanların periodonsiyumunu değerlendiren Bullon ve ark. zeytinyağında bulunan tekli doymamış yağ asitlerinin sıçanlarda oksidan metabolizma ve mitokondriyal elektron taşıma sistemine etki ederek sıçanların alt çenesinde alveoler kemik yıkımını azalttığını rapor etmişlerdir (132). Diğer taraftan sistemik HT uygulamasının kronik enflamatuvar bir hastalık olan periodontitisteki rolünü araştıran bir çalışma tespit edilmemiştir. Bu çalışma sistemik HT uygulamasının periodontal hastalıktaki alveolar kemik kaybı ve oksidatif stres parametrelerine olan etkisini inceleyen ilk çalışmadır.

Literatürde HT'nin farklı farmasötik şekillerde (112,135,171,172) ve farklı doz oranlarında (112,135,172) uygulandığı tespit edilmiştir. HT'nin farmasötik formları hayvanlarda intraperitoneal (173) ve gavaj (112,135) uygulaması ile, insanlarda zeytin yaprağı ekstraktı kapsül (171) ile sistemik olarak uygulandığı belirlenmiştir. HT'nin uygulama doz oranları değerlendirildiğinde 2mg/kg (172), 5 mg/kg (112) ve 10mg/kg (135) gibi farklı miktarlarda uygulanmakla birlikte, European Food Safety Authority

tarafından kullanılması gereken fizyolojik alt sınırının 5 mg/kg olduğunu rapor edilmiştir (100). Pirozzi ve ark. yapmış oldukları bir sıçan çalışmasında HT'nin herhangi bir toksik reaksiyon göstermeksizin günde 10 mg/kg dozunda antienflamatuvar ve antioksidan özelliklerini göstererek karaciğer hasarını azalttığını ve oksidatif stresi düzenlediğini bildirmişlerdir (135). Diğer taraftan HT'nin günde 2000 mg/kg'a kadar uygulanmasının toksik olmadığı rapor edilmiştir (174). Bu bilgiler ışığında bu çalışmada DP oluşturulan sıçanlarda sistemik HT uygulaması günde 10mg/kg dozunda ve gavaj yolu ile gerçekleştirildi.

Oksidatif stresin periodontal doku yıkımındaki rolünü aydınlatmak amacıyla dişeti oluğu sıvısı (DOS) (86,175,176), tükürük (177-179), serum/plazma (161,162) ve doku örnekleri (162,180,181) değerlendirilmektedir. Çalışmamızda deney hayvanlarında ağız içi sıvıları toplamının zor olması ve değerlendirilecek parametrelerin tespiti için yeterli hacimde elde edilememesi nedeniyle sıçanlardan serum ve dişeti örnekleri alındı. Alınan serum ve dişeti örneklerinde MDA, SOD ve GSH-Px değerlendirmesi yapıldı.

Kronik enflamatuvar hastalık patogeneğinde lipit peroksidasyon ürünleri oksidatif stresin önemli belirteçlerindedir. Lipit peroksidasyonun üç ana belirteci, tiyobarbitürik asit reaktif madde (TBAR), MDA ve izoprostanlardır (79,80). Günümüze kadar yapılan çalışmalarda kronik periodontitis hastalarında TBAR ve MDA seviyeleri araştırılmıştır (81,82). Serum (179,182,183), doku (82), DOS (184) ve tükürük (183) lipit peroksidasyon seviyelerinin kronik periodontitis hastalarında periodontal olarak sağlıklı kontrollere göre daha yüksek seviyede olduğu rapor edilmiştir. Farklı olarak periodontal olarak sağlıklı bireylerde serum MDA düzeylerinin kronik periodontitis hastalarına göre düşük olmadığını bildiren çalışmalar da vardır (185,186). İlave olarak periodontal dokularda enflamasyonun azalması ile DOS ve tükürük MDA seviyelerinde azalma olduğu da bildirilmiştir (81,86). Literatürde Thymoquinone, coenzim Q, melatonin ve resveratrol gibi çeşitli antioksidanların uygulanması ile serum MDA düzeylerinin azaldığını rapor eden (187-190) çalışmalar bulunmakla birlikte, serum MDA seviyelerinin değişmediğini rapor eden (191-193) çalışmalar da mevcuttur. Bizim çalışmamızda serum MDA seviyelerinin DP oluşturulan gruplarda periodontal olarak

sağlıklı kontrollere göre yüksek olmadığı tespit edildi. Dişeti dokusu MDA düzeyleri de gruplar arasında farklı değildi. Deneysel periodontitis oluşturulan gruplarda HT uygulamasının hem serum hem de doku MDA düzeylerine etki etmediği belirlendi.

Tüm aerobik hücrelerde bulunan ve oldukça önemli bir enzim olan SOD, dokulara zarar verme potansiyeli olan süperoksit radikalini etkisizleştirerek hücreleri serbest radikallerin olumsuz etkilerinden korur (87). Kan damarları, kalp, akciğerler, böbrekler ve plasenta dahil olmak üzere birçok dokuya, heparine ve tip I kollajene yüksek düzeyde bağlanabilir. Süperoksit dismutaz'ın ekspresyonunun artırılması ile ateroskleroz, hipertansiyon, koroner arter hastalığı ve diyabetik vaskülopati gibi hastalıkların önlenmesi öngörülebilmektedir (88).

Günümüze kadar yapılan hayvan (83,85) ve insan (82,89,90,179) çalışmalarında serum (179), doku (89), DOS (90) ve tükürük (82) SOD seviyeleri incelenmiş ve periodontal hastalıkta SOD düzeylerinin artış gösterdiği (82,89,179,194,195) veya azaldığı (90,196,197) gibi farklı sonuçlar rapor edilmiştir. Sobaniec ve ark. DP oluşturulan sıçanlarda serum SOD, GSH-Px ve glutatyon redüktaz enzimlerinin periodontal olarak sağlıklı gruba göre düşük, MDA düzeyinin ise yüksek olduğunu rapor etmişlerdir (83). Paralel olarak DP oluşturulan sıçanlarda SOD'un farmakolojik taklidinin uygulaması ile dişeti dokusu MDA seviyesinin önemli ölçüde azaltılabildiği tespit edilmiştir (85). Ellis ve ark. 44 kişide yaptığı bir çalışmada 6mm'den fazla periodontal cep derinliğini olan bölgelerden alınan dişeti dokusunda katalaz ve SOD seviyelerinin 3mm'den az cep derinliği olan sağlıklı dokulara göre daha az olduğunu tespit etmişlerdir (90). Farklı olarak Akalin ve ark. yapmış oldukları 26 periodontitisli ve 16 periodontal olarak sağlıklı toplam 42 bireyin diş eti örneklerinde SOD enzim miktarını incelemişler ve periodontitisli hastalarda SOD seviyelerinin periodontal olarak sağlıklı bireylere göre anlamlı derecede daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir (89). Bu durum periodontal hastalıkta artan reaktif oksijen türlerinin antioksidan sistem tarafından dengelenmeye çalışılması şeklinde açıklanmıştır. İlave olarak periodontal hastalıkta çeşitli antioksidanların uygulanması ile serum SOD düzeylerinin arttığını rapor eden (187,192,198) çalışmalar bulunmakla birlikte, diğer taraftan serum SOD seviyelerinin değişmediğini rapor eden (191,199) çalışmalar da mevcuttur. Bizim

çalışmamızda hem serum hem de doku SOD düzeylerinin DP oluşturulan gruplarda periodontal olarak sağlıklı kontrollere göre farklı değildi. Ek olarak HT uygulaması da serum ve doku SOD düzeyleri üzerine etki etmedi. Bu sonuç periodontal hastalıkta artan oksidatif stres ve azalan antioksidan mekanizmayı destekler niteliktedir.

Glutasyon peroksidaz, lipit peroksidasyonu sonucu oluşan lipit hidroperoksitlerin metabolizmasını düzenleyerek, lipit yıkımını önleyen önemli bir antioksidan enzimdir (41). GSH-Px aktivitesinin artmaşın dişeti dokusunda oksidatif strese karşı korunma sağladığı ve bu artış ile GSH-Px'in antioksidan dengesinde önemli bir rol oynayabileceği bildirilmiştir (13). Periodontal hastalıkta artan GSH-Px enzim düzeylerini rapor eden çalışmalar (82,162,180,200-202) olmakla beraber azaldığını (83,195) veya değişmediğini (86) bildiren çalışmalar da mevcuttur. Sobaniec ve ark. DP oluşturulan sıçanlarda serum SOD ve GSH-Px enzim seviyelerinin periodontal sağlıklı gruba göre düşük olduğunu, serum MDA seviyelerinin ise daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir (83). Huang ve ark. kronik periodontitis hastalarında DOS GSH-Px düzeylerinin periodontal yıkım göstergesi olan cep derinliği ve ataşman kaybındaki artış ile negatif korele olduğunu ve ilave olarak periodontal tedavi sonrasında hastaların DOS GSH-Px düzeyinin artış gösterdiğini rapor etmişlerdir (98).

Çeşitli antioksidanların uygulanması ile serum GSH-Px düzeylerinin arttığını rapor eden (192,198,203) çalışmalar bulunmakla birlikte, serum GSH-Px seviyelerinin değişmediğini rapor eden (199) çalışma da mevcuttur. Bizim çalışmamızda DP oluşturulan gruplarda hem serum hem de doku GSH-Px düzeyleri periodontal olarak sağlıklı kontrollerden farklı değildi. Ek olarak DP oluşturulan gruplarda HT uygulamasının serum ve doku GSH-Px düzeylerine etkisi olmadı. Bu sonuç periodontal hastalıkta artan oksidatif stres ve kronik enflamasyonun ilerleyen aşamalarında antioksidan mekanizmanın aktive olabileceği ile açıklanabilir. İlave olarak bu sonuç serum enzim düzeylerinin lokal doku cevabını yansıtmayabileceği hipotezini de destekler niteliktedir (204).

Hidroksitirozol'ün günlük 500 mg/kg doz olacak şekilde gavaj yoluyla verilmesinin toksik olmadığı ve klinik, histolojik ve biyokimyasal değerlendirmede de herhangi bir yan etkisinin olmadığı rapor edilmiştir (107). İlave olarak HT'nin 2000 mg/kg olacak şekilde uygulanmasında da toksik etki göstermediği bildirilmiştir (174). Bizim çalışmamızda karaciğer ve böbrek hasarını değerlendirmek amacıyla serum ALT, AST, GGT, ALP, UREA ve CREA enzim düzeyleri değerlendirildi ve tüm enzim seviyelerinin toksik değerin çok altında olduğu belirlendi. Bu çalışmanın sonuçları Literatürdeki HT uygulaması yapılan ve ALT (142), AST (143,145), GGT (143) ALP (144), UREA (146) ve CREA (146) düzeylerini değerlendiren diğer çalışmaların sonuçlarını destekler niteliktedir.

Literatürde sıçanlarda ligatür uygulaması ile DP oluşturularak alveolar kemik kaybı gerçekleşmektedir (156,164). Alveolar kemik kaybı ölçümleri mikro bilgisayarlı tomografi (205) gibi üç boyutlu görüntüleme sistemleri ile değerlendirildiği gibi histolojik ölçüm ve boyama yöntemleri (162,206,207) gibi iki boyutlu olarak da değerlendirilebilmektedir. İki boyutlu kemik kaybı değerlendirmesi bazı çalışmalarda MSS ile AKT arasındaki mesafenin ölçülmesi (162,207) ile yapılırken, bazı çalışmalarda da alan bazında (206) yapılmaktadır. Bahsedilen iki ölçüm tekniğinin karşılaştırıldığı bir çalışmada 15. günde her iki tekniğin alveolar kemik kayıplarının değerlendirilmesinde benzer sonuçlar verdiği, diğer taraftan uzun dönem değerlendirmede ise MSS ile AKT arasındaki mesafenin ölçülmesi ile daha sağlıklı sonuçlar alındığı bildirilmiştir (156).

Çeşitli antioksidanların uygulanması ile alveolar kemik kayıplarının azaldığını rapor eden çalışmalar (24,165,208) bulunmaktadır. Diğer taraftan antioksidanların düşük dozlarda kullanımının alveolar kemik kaybını etkilemediğini, dozun artırılması ile alveolar kemik kaybının azaltılabileceği bildirilmiştir (204). Çalışmamızda alveolar kemik kaybı miktarı, sıçanların ikinci azı dişlerinin MSS ile AKT arasındaki mesafelerinin ölçümü ile hesaplandı. Deneysel periodontitis gruplarının meziyal, furkasyon ve distal yüzeylerindeki alveolar kemik kayıp miktarları PS gruplarına göre daha fazlaydı. Deneysel periodontitis grupları kendi içlerinde değerlendirildiğinde ise, HT uygulaması alveolar kemik kayıp miktarına etki etmedi.

Periodontal hastalıkla ilişkili alveoler kemik yıkımında RANK-RANKL-OPG etkileşimi kritik bir rol oynamaktadır. RANKL, Osteoklast prekürsör hücrelerinin yüzeylerinde bulunan RANK reseptörüne bağlanarak, osteoklastların aktivasyonunu ve olgunlaşmasını sağlar (144). Mezenkimal hücreler tarafından sentezlenen OPG ise RANKL'ın RANK reseptörüne bağlanmasını engelleyen tuzak bir molekül olarak rol oynar ve osteoklastların farklılaşmasını ve aktivasyonunu bloke ederek osteoklastogenezisi engeller (10,12). RANKL ve OPG seviyelerindeki değişim hem periodontal hastalıkta alveolar kemik kaybının belirlenmesinde hem de osteoporoz (209) gibi sistemik durumlardaki kemik kaybının değerlendirilmesinde belirteç olarak kullanılabilir (210-213). Alveolar kemik kaybında RANKL ve OPG seviyelerinin artması veya azalması tek başına değerlendirilebileceği gibi RANKL/OPG oranındaki değişim de periodontal hastalıkta alveolar kemik kaybının değerlendirilmesinde kullanılmaktadır (165,208,214-217).

Yapılan çalışmalarda serum (204) ve doku (165,217) RANKL seviyelerinin artış gösterdiği ve OPG düzeylerinin azaldığı durumlarda alveolar kemik kayıplarının arttığı bildirilmiştir. Bu durum çeşitli antioksidan ajanların sistemik olarak uygulanması ile engellenebilmektedir (22,24). Periodontal hastalıkta sistemik antioksidan uygulanması ile RANKL seviyesinin azaldığı ve OPG düzeylerinin arttığı bildirilmiştir (208,218,219). Bizim çalışmamızda RANKL, OPG ve RANKL/OPG değerlerinin hem boyanma alanı hem de boyanma yoğunlukları immünohistokimyasal olarak değerlendirilmiştir (165,208,215-217).

Kemiğin yapısının incelemesinde histolojik değerlendirme oldukça sık kullanılan bir yöntemdir. Çalışmalarda alveolar kemik kaybını değerlendirmek için histolojik kesitlerde RANKL ve OPG boyanma alanına ve yoğunluğuna bakılmaktadır. Boyanma yoğunluğu "intensity" histolojik kesitlerdeki hücrelerin ekspresyon derecesini gösterirken, boyanma alanı ise kesitlerdeki belirli bir alan içindeki ekspresyon yapan hücre sayısını ifade etmektedir (220). Boyanma yoğunluğu değerlendirmesi bilgisayar ortamında yazılımın hassas değerler vermesi ile yapılırken, boyanma alanı ölçümü ise araştırmacının boyanan hücreleri tek tek seçerek sayısal değerleri kaydetmesi ile gerçekleştirilmektedir. Boyanma alanı daha kolay bir teknik olması dolayısıyla daha yaygın

bir şekilde kullanılmakta iken boyanma yoğunluğu değerlendirmesi daha ayrıntılı bilgi vermekte ancak daha fazla vakit gerektirmektedir (220).

Bizim çalışmamızda RANKL ve OPG seviyeleri tüm gruplarda hem boyanma alanı hem de boyanma yoğunluğu olarak değerlendirildi. Buna göre DP-SF grubunun RANKL boyanma alanı ve boyanma yoğunluğu düzeyleri PS-SF grubundan daha yüksekti. DP-SF grubu OPG boyanma alanı düzeyleri PS-SF grubundan farklı değildi, diğer taraftan DP-SF grubu OPG boyanma yoğunluğu seviyeleri PS-SF grubundan daha düşüktü. RANKL/OPG boyanma alanı değerleri SF uygulanan gruplar arasında farklı değildi, buna karşın DP-SF grubu RANKL/OPG boyanma yoğunluğu PS-SF grubundan daha yüksekti. Bu sonuçlar literatürdeki periodontal hastalıkta artan RANKL, RANKL/OPG oranı ve azalan OPG düzeylerini gösteren çalışmaları destekler niteliktedir (208,218,219). İlave olarak bu çalışmanın sonuçları göz önünde bulundurulduğunda, immünohistokimyasal incelemelerde boyanma yoğunluğu düzeylerinin değerlendirilmesinin daha hassas sonuçlar verebilmesi açısından önemli olduğu düşünülmektedir.

Hidroksitirozol uygulamasının RANKL ve OPG düzeylerine olan etkisi değerlendirildiğinde, HT uygulaması yapılan DP oluşturulan grupta RANKL hem boyanma alanı hem de boyanma yoğunluğu değerleri SF uygulaması yapılan DP grubuna göre daha düşüktü. OPG hem boyanma alanı hem de boyanma yoğunluğu değerleri ise DP-HT ve DP-SF grupları arasında farklı değildi. Bu durum azalan RANKL seviyesi sonucu yarışmalı inhibitörü olan OPG ihtiyacını azaltmış olabileceği hipotezi ile açıklanabilir (215). RANKL/OPG boyanma alanı değerlendirildiğinde, bu oranın hem boyanma alanı hem de boyanma yoğunluğu düzeyleri DP-HT grubunda DP-SF grubuna göre daha düşüktü. Bu sonuçlar literatürdeki periodontal hastalıkta sumac (208), resveratrol (219), melatonin (218), herbacetin (221), magnolol (222) ve curcumin (215) gibi çeşitli antioksidanların uygulaması ile azalan RANKL, RANKL/OPG oranı ve artan OPG düzeylerini gösteren çalışmaları destekler niteliktedir.

Literatür değerlendirildiğinde DP oluşturulan sıçanlarda HT uygulaması yapılan bir çalışma tespit edilmediğinden bizim çalışmamızın sonuçlarının tam olarak

karşılaştırılması mümkün olmadı. İlave olarak bu çalışmanın limitasyonları alveolar kemik kayıplarının histomorfometrik ölçümlerinin sadece iki boyutlu olarak değerlendirilmiş olması ve farklı bir antioksidan etken maddenin karşılaştırılmamış olmasıdır.



6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmanın sınırları dahilinde;

1. Sistemik HT uygulamasının serum ve dişeti dokusu MDA, SOD ve GSH-Px seviyelerine etkisinin olmadığı,
2. Serum enzim düzeylerinin doku enzim seviyelerini yansıtmayabileceği bu nedenle periodontal hastalıkta sistemik antioksidan uygulamasının bölgesel doku yıkımı üzerine etkisinin değerlendirilmesinde sadece serum değerlerinin değil doku seviyelerinin de incelenmesi gerektiği,
3. Sistemik HT uygulaması yapılan gruplarda karaciğer ve böbrek enzimleri olan ALT, AST, GGT, ALP, UREA ve CREA serum düzeylerinin toksik değerin çok altında olduğu, böylelikle HT'nin günlük 10mg/kg alınmasının toksik etkiler göstermediği,
4. Sistemik HT uygulamasının periodontal hastalıkta lokal doku yıkımının olduğu bölgelerde artan RANKL ve RANKL/OPG oranını hem boyanma alanı hem de boyanma yoğunluğu değerlerini azalttığı bu nedenle HT uygulamasının alveolar kemik kaybını önleyebileceği, diğer taraftan bu durumun histomorfometrik ölçümlerde desteklenmediği,
5. Periodontal hastalıkta OPG seviyelerinin azaldığı, sistemik HT uygulamasının OPG düzeylerine etkisinin olmadığı,
6. İmmünohistokimyasal değerlendirmede boyanma yoğunluğu değerlendirmesinin daha hassas bulgular verebileceği

sonuçları tespit edildi.

Bilgilerimiz dahilinde çalışmamız DP oluşturulan sıçanlarda HT uygulamasının alveolar kemik yıkımı ve oksidatif stres parametreleri üzerine olan etkisini araştıran ilk çalışmadır. Sistemik HT uygulamasının alveolar kemik yıkımını azaltabileceği hipotezi immünohistokimyasal değerlendirmede desteklenirken histomorfometrik ölçümlerde desteklenmedi. Bu nedenle HT'nin alveolar kemik kaybı seviyelerine olan etkisinin mikro bilgisayarlı tomografi ile üç boyutlu hacimsel olarak incelenmesinin gerekli

olduğu dūřılmektedir. Ek olarak HT'nin DP'de antioksidan özelliklerinin farklı doz ve sıklıkta, farklı antioksidanlar ile karşılaştırıldığı ve total oksidan/antioksidan seviyelerinin de değerlendirildiği ilave çalışmalarda araştırılması gerektiği dūřünlmektedir.



7. KAYNAKLAR

1. **Berezow AB, Darveau RP.** Microbial shift and periodontitis. *Periodontology 2000* **2011**; 55(1):36-47.
2. **Kassebaum NJ, Bernabe E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W.** Global Burden of Severe Tooth Loss: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Dent Res* **2014**; 93(7 Suppl):20S-28S.
3. **Marsh PD, Moter A, Devine DA.** Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. *Periodontology 2000* **2011**; 55(1):16-35.
4. **Mah TF, O'Toole GA.** Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* **2001**; 9(1):34-39.
5. **Kuramitsu HK, He X, Lux R, Anderson MH, Shi W.** Interspecies interactions within oral microbial communities. *Microbiol Mol Biol Rev* **2007**; 71(4):653-670.
6. **Schroeder HE, Listgarten MA.** The gingival tissues: the architecture of periodontal protection. *Periodontology 2000* **1997**; 13:91-120.
7. **Hornef MW, Wick MJ, Rhen M, Normark S.** Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* **2002**; 3(11):1033-1040.
8. **Dentino A, Lee S, Mailhot J, Hefti AF.** Principles of periodontology. *Periodontology 2000* **2013**; 61(1):16-53.
9. **Kinane DF.** Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontology 2000* **2001**; 25:8-20.
10. **Bartold PM, Cantley MD, Haynes DR.** Mechanisms and control of pathologic bone loss in periodontitis. *Periodontology 2000* **2010**; 53:55-69.
11. **Taubman MA, Valverde P, Han X, Kawai T.** Immune response: the key to bone resorption in periodontal disease. *J Periodontol* **2005**; 76(11 Suppl):2033-2041.
12. **Leibbrandt A, Penninger JM.** RANK/RANKL: regulators of immune responses and bone physiology. *Ann N Y Acad Sci* **2008**; 1143:123-150.
13. **Cheeseman KH, Slater TF.** An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* **1993**; 49(3):481-493.
14. **Chapple IL, Matthews JB.** The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontology 2000* **2007**; 43:160-232.
15. **Lean JM, Davies JT, Fuller K, Jagger CJ, Kirstein B, Partington GA, Urry ZL, Chambers TJ.** A crucial role for thiol antioxidants in estrogen-deficiency bone loss. *J Clin Invest* **2003**; 112(6):915-923.
16. **Jaspers I, Zhang W, Brighton LE, Carson JL, Styblo M, Beck MA.** Selenium deficiency alters epithelial cell morphology and responses to influenza. *Free Radic Biol Med* **2007**; 42(12):1826-1837.
17. **Formica JV, Regelson W.** Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol* **1995**; 33(12):1061-1080.
18. **Leitao RF, Rocha FA, Chaves HV, Lima V, Cunha FQ, Ribeiro RA, Brito GA.** Locally applied isosorbide decreases bone resorption in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol* **2004**; 75(9):1227-1232.

19. **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. *J Clin Periodontol* **2005**; 32(10):1062-1068.
20. **Feng R, Lu Y, Bowman LL, Qian Y, Castranova V, Ding M.** Inhibition of activator protein-1, NF-kappaB, and MAPKs and induction of phase 2 detoxifying enzyme activity by chlorogenic acid. *J Biol Chem* **2005**; 280(30):27888-27895.
21. **Nader MA, el-Agamy DS, Suddek GM.** Protective effects of propolis and thymoquinone on development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Arch Pharm Res* **2010**; 33(4):637-643.
22. **Tamaki N, Cristina Orihuela-Campos R, Inagaki Y, Fukui M, Nagata T, Ito HO.** Resveratrol improves oxidative stress and prevents the progression of periodontitis via the activation of the Sirt1/AMPK and the Nrf2/antioxidant defense pathways in a rat periodontitis model. *Free Radic Biol Med* **2014**; 75:222-229.
23. **Varela-Lopez A, Bullon P, Giampieri F, Quiles JL.** Non-Nutrient, Naturally Occurring Phenolic Compounds with Antioxidant Activity for the Prevention and Treatment of Periodontal Diseases. *Antioxidants (Basel)* **2015**; 4(3):447-481.
24. **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. *J Periodontol* **2016**; 87(5):e82-90.
25. **Khurana S, Venkataraman K, Hollingsworth A, Piche M, Tai TC.** Polyphenols: benefits to the cardiovascular system in health and in aging. *Nutrients* **2013**; 5(10):3779-3827.
26. **Fabiani R, Rosignoli P, De Bartolomeo A, Fuccelli R, Servili M, Montedoro GF, Morozzi G.** Oxidative DNA damage is prevented by extracts of olive oil, hydroxytyrosol, and other olive phenolic compounds in human blood mononuclear cells and HL60 cells. *J Nutr* **2008**; 138(8):1411-1416.
27. **Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T.** Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens* **2000**; 18(6):655-673.
28. **Gomez-Acebo E, Alcamí Pertejo J, Aunon-Calles D.** Topical use of Hydroxytyrosol and Derivatives for the Pervention of HIV Infection. WO 067302 A1; 2011.
29. **Petersen PE, Ogawa H.** The global burden of periodontal disease: towards integration with chronic disease prevention and control. *Periodontology 2000* **2012**; 60(1):15-39.
30. **Page RC, Kornman KS.** The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontology 2000* **1997**; 14:9-11.
31. **Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE.** Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* **2005**; 43(11):5721-5732.
32. **Palmer RJ, Jr., Gordon SM, Cisar JO, Kolenbrander PE.** Coaggregation-mediated interactions of streptococci and actinomyces detected in initial human dental plaque. *J Bacteriol* **2003**; 185(11):3400-3409.
33. **Socransky SS, Haffajee AD.** Periodontal microbial ecology. *Periodontology 2000* **2005**; 38:135-187.
34. **Dale BA, Fredericks LP.** Antimicrobial peptides in the oral environment: expression and function in health and disease. *Curr Issues Mol Biol* **2005**; 7(2):119-133.
35. **Vishal Tandon, Gupta MD, Tandon R.** Free Radical / Reaktive Oxygen Species. *JK-Practitioner* **2005**; 12(3):143-148.
36. **Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM.** Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1993**; 90(17):7915-7922.
37. **Halliwell B, Whiteman M.** Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* **2004**; 142(2):231-255.

38. **Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ.** Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J* **1997**; 324 (Pt 1):1-18.
39. **Halliwell B.** Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med* **1991**; 91(3C):14S-22S.
40. **Box HC, Freund HG, Budzinski EE, Wallace JC, Maccubbin AE.** Free radical-induced double base lesions. *Radiat Res* **1995**; 141(1):91-94.
41. **Halliwell B, Gutteridge JMC.** Free Radicals in Biology and Medicine: Oxford: Oxford University. **2007**.
42. **Janero DR.** Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med* **1990**; 9(6):515-540.
43. **Draper HH, Hadley M.** Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* **1990**; 186:421-431.
44. **Halliwell B.** Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans* **2007**; 35(Pt 5):1147-1150.
45. **Halliwell B.** Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* **2006**; 141(2):312-322.
46. **Young IS, Woodside JV.** Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* **2001**; 54(3):176-186.
47. **Halliwell B, Gutteridge JM.** Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* **1990**; 186:1-85.
48. **Niki E.** Interaction of ascorbate and a-tocopherol. *Ann N Y Acad Sci* **1987**(498):186-199.
49. **Niki E.** a-Tocopherol. *New York: Marcel Dekker Inc* **1996**(3):25.
50. **Battino M, Bullon P, Wilson M, Newman H.** Oxidative injury and inflammatory periodontal diseases: the challenge of anti-oxidants to free radicals and reactive oxygen species. *Crit Rev Oral Biol Med* **1999**; 10(4):458-476.
51. **Halliwell B.** How to characterize an antioxidant: an update. *Biochem Soc Symp* **1995**; 61:73-101.
52. **Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I.** Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* **1999**; 32(8):595-603.
53. **Segal A.** How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol* **2005**(23):197-223.
54. **Bax BE, Alam AS, Banerji B, Bax CM, Bevis PJ, Stevens CR, Moonga BS, Blake DR, Zaidi M.** Stimulation of osteoclastic bone resorption by hydrogen peroxide. *Biochem Biophys Res Commun* **1992**; 183(3):1153-1158.
55. **Hall TJ, Schaeublin M, Jeker H, Fuller K, Chambers TJ.** The role of reactive oxygen intermediates in osteoclastic bone resorption. *Biochem Biophys Res Commun* **1995**; 207(1):280-287.
56. **Garrett IR, Boyce BF, Oreffo RO, Bonewald L, Poser J, Mundy GR.** Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. *J Clin Invest* **1990**; 85(3):632-639.
57. **Key LL, Jr., Wolf WC, Gundberg CM, Ries WL.** Superoxide and bone resorption. *Bone* **1994**; 15(4):431-436.
58. **Steinbeck MJ, Appel WH, Jr., Verhoeven AJ, Karnovsky MJ.** NADPH-oxidase expression and in situ production of superoxide by osteoclasts actively resorbing bone. *J Cell Biol* **1994**; 126(3):765-772.
59. **Moseley R, Waddington RJ, Embery G, Rees SG.** The modification of alveolar bone proteoglycans by reactive oxygen species in vitro. *Connect Tissue Res* **1998**; 37(1-2):13-28.
60. **Waddington RJ, Moseley R, Embery G.** Reactive oxygen species: a potential role in the pathogenesis of periodontal diseases. *Oral Dis* **2000**; 6(3):138-151.

61. **Canakci CF, Cicek Y, Canakci V.** Reactive oxygen species and human inflammatory periodontal diseases. *Biochemistry (Mosc)* **2005**; 70(6):619-628.
62. **Giannobile WV, Al-Shammari KF, Sarment DP.** Matrix molecules and growth factors as indicators of periodontal disease activity. *Periodontology 2000* **2003**; 31:125-134.
63. **Bartold PM, Wiebkin OW, Thonard JC.** The effect of oxygen-derived free radicals on gingival proteoglycans and hyaluronic acid. *J Periodontal Res* **1984**; 19(4):390-400.
64. **Moseley R, Waddington R, Evans P, Halliwell B, Embery G.** The chemical modification of glycosaminoglycan structure by oxygen-derived species in vitro. *Biochim Biophys Acta* **1995**; 1244(2-3):245-252.
65. **Moseley R, Waddington RJ, Embery G.** Degradation of glycosaminoglycans by reactive oxygen species derived from stimulated polymorphonuclear leukocytes. *Biochim Biophys Acta* **1997**; 1362(2-3):221-231.
66. **Mukhopadhyay CK, Chatterjee IB.** Free metal ion-independent oxidative damage of collagen. Protection by ascorbic acid. *J Biol Chem* **1994**; 269(48):30200-30205.
67. **Monboisse JC, Borel JP.** Oxidative damage to collagen. *EXS* **1992**; 62:323-327.
68. **Slatter DA, Paul RG, Murray M, Bailey AJ.** Reactions of lipid-derived malondialdehyde with collagen. *J Biol Chem* **1999**; 274(28):19661-19669.
69. **Sage EH.** Regulation of interactions between cells and extracellular matrix: a command performance on several stages. *J Clin Invest* **2001**; 107(7):781-783.
70. **Rittie L, Monboisse JC, Gorisse MC, Gillery P.** Malondialdehyde binding to proteins dramatically alters fibroblast functions. *J Cell Physiol* **2002**; 191(2):227-236.
71. **Soell M, Elkaim R, Tenenbaum H.** Cathepsin C, matrix metalloproteinases, and their tissue inhibitors in gingiva and gingival crevicular fluid from periodontitis-affected patients. *J Dent Res* **2002**; 81(3):174-178.
72. **Pozo P, Valenzuela MA, Melej C, Zaldivar M, Puente J, Martinez B, Gamonal J.** Longitudinal analysis of metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and clinical parameters in gingival crevicular fluid from periodontitis-affected patients. *J Periodontal Res* **2005**; 40(3):199-207.
73. **Tuter G, Kurtis B, Serdar M, Yucel A, Ayhan E, Karaduman B, Ozcan G.** Effects of phase I periodontal treatment on gingival crevicular fluid levels of matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1. *J Clin Periodontol* **2005**; 32(9):1011-1015.
74. **Kawaguchi Y, Tanaka H, Okada T, Konishi H, Takahashi M, Ito M, Asai J.** The effects of ultraviolet A and reactive oxygen species on the mRNA expression of 72-kDa type IV collagenase and its tissue inhibitor in cultured human dermal fibroblasts. *Arch Dermatol Res* **1996**; 288(1):39-44.
75. **Hemmerlein B, Johanns U, Halbfass J, Bottcher T, Heuser M, Radzun HJ, Thelen P.** The balance between MMP-2/-9 and TIMP-1/-2 is shifted towards MMP in renal cell carcinomas and can be further disturbed by hydrogen peroxide. *Int J Oncol* **2004**; 24(5):1069-1076.
76. **Savaraj N, Wei Y, Unate H, Liu PM, Wu CJ, Wangpaichitr M, Xia D, Xu HJ, Hu SX, Tien Kuo M.** Redox regulation of matrix metalloproteinase gene family in small cell lung cancer cells. *Free Radic Res* **2005**; 39(4):373-381.
77. **Ozawa T.** Mitochondrial DNA mutations in myocardial diseases. *Eur Heart J* **1995**; 16 Suppl O:10-14.
78. **Van Houten B, Woshner V, Santos JH.** Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress. *DNA Repair (Amst)* **2006**; 5(2):145-152.
79. **Palys MD, Haffajee AD, Socransky SS, Giannobile WV.** Relationship between C-telopeptide pyridinoline cross-links (ICTP) and putative periodontal pathogens in periodontitis. *J Clin Periodontol* **1998**; 25(11 Pt 1):865-871.

80. **Roberts LJ, 2nd, Morrow JD.** Products of the isoprostane pathway: unique bioactive compounds and markers of lipid peroxidation. *Cell Mol Life Sci* **2002**; 59(5):808-820.
81. **Tuter G, Kurtis B, Serdar M.** Interleukin-1beta and thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) levels after phase I periodontal therapy in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol* **2001**; 72(7):883-888.
82. **Panjamurthy K, Manoharan S, Ramachandran CR.** Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with periodontitis. *Cell Mol Biol Lett* **2005**; 10(2):255-264.
83. **Sobaniec H, Sobaniec-Lotowska ME.** Morphological examinations of hard tissues of periodontium and evaluation of selected processes of lipid peroxidation in blood serum of rats in the course of experimental periodontitis. *Med Sci Monit* **2000**; 6(5):875-881.
84. **Di Paola R, Marzocco S, Mazzon E, Dattola F, Rotondo F, Britti D, De Majo M, Genovese T, Cuzzocrea S.** Effect of aminoguanidine in ligature-induced periodontitis in rats. *J Dent Res* **2004**; 83(4):343-348.
85. **Di Paola R, Mazzon E, Rotondo F, Dattola F, Britti D, De Majo M, Genovese T, Cuzzocrea S.** Reduced development of experimental periodontitis by treatment with M40403, a superoxide dismutase mimetic. *Eur J Pharmacol* **2005**; 516(2):151-157.
86. **Tsai CC, Chen HS, Chen SL, Ho YP, Ho KY, Wu YM, Hung CC.** Lipid peroxidation: a possible role in the induction and progression of chronic periodontitis. *J Periodontal Res* **2005**; 40(5):378-384.
87. **Petersen SV, Oury TD, Ostergaard L, Valnickova Z, Wegrzyn J, Thogersen IB, Jacobsen C, Bowler RP, Fattman CL, Crapo JD, Enghild JJ.** Extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) binds to type I collagen and protects against oxidative fragmentation. *J Biol Chem* **2004**; 279(14):13705-13710.
88. **Nozik-Grayck E, Suliman HB, Piantadosi CA.** Extracellular superoxide dismutase. *Int J Biochem Cell Biol* **2005**; 37(12):2466-2471.
89. **Akalin FA, Toklu E, Renda N.** Analysis of superoxide dismutase activity levels in gingiva and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis and periodontally healthy controls. *J Clin Periodontol* **2005**; 32(3):238-243.
90. **Ellis SD, Tucci MA, Serio FG, Johnson RB.** Factors for progression of periodontal diseases. *J Oral Pathol Med* **1998**; 27(3):101-105.
91. **Makarov SS.** NF-kappaB as a therapeutic target in chronic inflammation: recent advances. *Mol Med Today* **2000**; 6(11):441-448.
92. **Forman HJ, Fukuto JM, Torres M.** Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers. *Am J Physiol Cell Physiol* **2004**; 287(2):C246-256.
93. **Fratelli M, Goodwin LO, Orom UA, Lombardi S, Tonelli R, Mengozzi M, Ghezzi P.** Gene expression profiling reveals a signaling role of glutathione in redox regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**; 102(39):13998-14003.
94. **Rahman I, Biswas SK, Jimenez LA, Torres M, Forman HJ.** Glutathione, stress responses, and redox signaling in lung inflammation. *Antioxid Redox Signal* **2005**; 7(1-2):42-59.
95. **Droge W.** Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* **2002**; 82(1):47-95.
96. **Adonogianaki E, Moughal NA, Mooney J, Stirrups DR, Kinane DF.** Acute-phase proteins in gingival crevicular fluid during experimentally induced gingivitis. *J Periodontal Res* **1994**; 29(3):196-202.
97. **Wei PF, Ho KY, Ho YP, Wu YM, Yang YH, Tsai CC.** The investigation of glutathione peroxidase, lactoferrin, myeloperoxidase and interleukin-1beta in gingival crevicular fluid: implications for oxidative stress in human periodontal diseases. *J Periodontal Res* **2004**; 39(5):287-293.

98. **Huang P, Su T, Wang H.** [The relationship between GPx activity in gingival fluid and clinical parameters of adult periodontitis]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* **2000**; 18(2):106-108.
99. **Reyes JJ, Villanueva B, Lopez-Villodres JA, De La Cruz JP, Romero L, Rodriguez-Perez MD, Rodriguez-Gutierrez G, Fernandez-Bolanos J, Gonzalez-Correa JA.** Neuroprotective Effect of Hydroxytyrosol in Experimental Diabetes Mellitus. *J Agric Food Chem* **2017**; 65(22):4378-4383.
100. **Cristina Vilaplana-Perez, David Aunon, Libia A, Garcia-Flores.** Hydroxytyrosol and potential uses in cardiovascular diseases, cancer, and AIDS. In: Lu J, editor. Volume 1; 2014. p 1-11.
101. **Ramirez-Tortosa MC, Granados S, Quiles JL.** Chemical composition, types and characteristics of olive oil. In *Olive Oil and Health* 2006:45-62.
102. **Brenes M, Garcia A, Garcia P, Garrido A.** Rapid and complete extraction of phenols from olive oil and determination by means of a coulometric electrode array system. *J Agric Food Chem* **2000**; 48(11):5178-5183.
103. **Owen RW, Giacosa A, Hull WE, Haubner R, Spiegelhalter B, Bartsch H.** The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *Eur J Cancer* **2000**; 36(10):1235-1247.
104. **Visioli F, Galli C, Bornet F, Mattei A, Patelli R, Galli G, Caruso D.** Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans. *FEBS Lett* **2000**; 468(2-3):159-160.
105. **Miro-Casas E, Covas MI, Fito M, Farre-Albadalejo M, Marrugat J, de la Torre R.** Tyrosol and hydroxytyrosol are absorbed from moderate and sustained doses of virgin olive oil in humans. *Eur J Clin Nutr* **2003**; 57(1):186-190.
106. **Tuck KL, Freeman MP, Hayball PJ, Stretch GL, Stupans I.** The in vivo fate of hydroxytyrosol and tyrosol, antioxidant phenolic constituents of olive oil, after intravenous and oral dosing of labeled compounds to rats. *J Nutr* **2001**; 131(7):1993-1996.
107. **Aunon-Calles D, Canut L, Visioli F.** Toxicological evaluation of pure hydroxytyrosol. *Food Chem Toxicol* **2013**; 55:498-504.
108. **Foti MC.** Antioxidant properties of phenols. *J Pharm Pharmacol* **2007**; 59(12):1673-1685.
109. **Brezani V, Smejkal K, Hosek J, Tomasova V.** Anti-inflammatory Natural Prenylated Phenolic Compounds - Potential Lead Substances. *Curr Med Chem* **2017**.
110. **Ambriz-Perez DL, Bang WY, Nair V, Angulo-Escalante MA, Cisneros-Zevallos L, Heredia JB.** Protective Role of Flavonoids and Lipophilic Compounds from *Jatropha platyphylla* on the Suppression of Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Inflammation in Macrophage Cells. *J Agric Food Chem* **2016**; 64(9):1899-1909.
111. **Maroon JC, Bost JW, Maroon A.** Natural anti-inflammatory agents for pain relief. *Surg Neurol Int* **2010**; 1:80.
112. **Silva S, Sepodes B, Rocha J, Direito R, Fernandes A, Brites D, Freitas M, Fernandes E, Bronze MR, Figueira ME.** Protective effects of hydroxytyrosol-supplemented refined olive oil in animal models of acute inflammation and rheumatoid arthritis. *J Nutr Biochem* **2015**; 26(4):360-368.
113. **Cicerale S, Lucas L, Keast R.** Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil. *Int J Mol Sci* **2010**; 11(2):458-479.
114. **Bulotta S, Celano M, Lepore SM, Montalcini T, Pujia A, Russo D.** Beneficial effects of the olive oil phenolic components oleuropein and hydroxytyrosol: focus on protection against cardiovascular and metabolic diseases. *J Transl Med* **2014**; 12:219.
115. **Witztum JL, Steinberg D.** Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* **1991**; 88(6):1785-1792.
116. **Spagnoli LG, Bonanno E, Sangiorgi G, Mauriello A.** Role of inflammation in atherosclerosis. *J Nucl Med* **2007**; 48(11):1800-1815.

117. **Zrelli H, Matsuoka M, Kitazaki S, Zarrouk M, Miyazaki H.** Hydroxytyrosol reduces intracellular reactive oxygen species levels in vascular endothelial cells by upregulating catalase expression through the AMPK-FOXO3a pathway. *Eur J Pharmacol* **2011**; 660(2-3):275-282.
118. **Gonzalez-Santiago M, Martin-Bautista E, Carrero JJ, Fonolla J, Baro L, Bartolome MV, Gil-Loyzaga P, Lopez-Huertas E.** One-month administration of hydroxytyrosol, a phenolic antioxidant present in olive oil, to hyperlipemic rabbits improves blood lipid profile, antioxidant status and reduces atherosclerosis development. *Atherosclerosis* **2006**; 188(1):35-42.
119. **Frankel EN.** Nutritional and biological properties of extra virgin olive oil. *J Agric Food Chem* **2011**; 59(3):785-792.
120. **Visioli F.** Olive oil phenolics: where do we stand? Where should we go? *J Sci Food Agric* **2012**; 92(10):2017-2019.
121. **Granados-Principal S, Quiles JL, Ramirez-Tortosa CL, Sanchez-Rovira P, Ramirez-Tortosa MC.** Hydroxytyrosol: from laboratory investigations to future clinical trials. *Nutr Rev* **2010**; 68(4):191-206.
122. **Fabiani R, De Bartolomeo A, Rosignoli P, Servili M, Montedoro GF, Morozzi G.** Cancer chemoprevention by hydroxytyrosol isolated from virgin olive oil through G1 cell cycle arrest and apoptosis. *Eur J Cancer Prev* **2002**; 11(4):351-358.
123. **Shahrzad S, Bitsch I.** Determination of some pharmacologically active phenolic acids in juices by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* **1996**; 741(2):223-231.
124. **Kroes BH, van den Berg AJ, Quarles van Ufford HC, van Dijk H, Labadie RP.** Anti-inflammatory activity of gallic acid. *Planta Med* **1992**; 58(6):499-504.
125. **Tutino V, Caruso MG, Messa C, Perri E, Notarnicola M.** Antiproliferative, antioxidant and anti-inflammatory effects of hydroxytyrosol on human hepatoma HepG2 and Hep3B cell lines. *Anticancer Res* **2012**; 32(12):5371-5377.
126. **Ashrafi M, Bathaie SZ, Abroun S.** High Expression of Cyclin D1 and p21 in N-Nitroso-N-Methylurea-Induced Breast Cancer in Wistar Albino Female Rats. *Cell J* **2012**; 14(3):193-202.
127. **Alonso A, Martinez-Gonzalez MA.** Olive oil consumption and reduced incidence of hypertension: the SUN study. *Lipids* **2004**; 39(12):1233-1238.
128. **Abaza L, Talorete TP, Yamada P, Kurita Y, Zarrouk M, Isoda H.** Induction of growth inhibition and differentiation of human leukemia HL-60 cells by a Tunisian gerboui olive leaf extract. *Biosci Biotechnol Biochem* **2007**; 71(5):1306-1312.
129. **Warleta F, Campos M, Allouche Y, Sanchez-Quesada C, Ruiz-Mora J, Beltran G, Gaforio JJ.** Squalene protects against oxidative DNA damage in MCF10A human mammary epithelial cells but not in MCF7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Food Chem Toxicol* **2010**; 48(4):1092-1100.
130. **Da-Peng Yang D-XK, Hong-Yu Zhang.** Multiple pharmacological effects of olive oil phenols. *Food Chemistry* **2007**; 104:1269-1271p.
131. **Bullon P, Quiles JL, Morillo JM, Rubini C, Goteri G, Granados-Principal S, Battino M, Ramirez-Tortosa M.** Gingival vascular damage in atherosclerotic rabbits: hydroxytyrosol and squalene benefits. *Food Chem Toxicol* **2009**; 47(9):2327-2331.
132. **Bullon P, Battino M, Varela-Lopez A, Perez-Lopez P, Granados-Principal S, Ramirez-Tortosa MC, Ochoa JJ, Cordero MD, Gonzalez-Alonso A, Ramirez-Tortosa CL, Rubini C, Zizzi A, Quiles JL.** Diets based on virgin olive oil or fish oil but not on sunflower oil prevent age-related alveolar bone resorption by mitochondrial-related mechanisms. *PLoS One* **2013**; 8(9):e74234.
133. **Carvalho Rde S, de Souza CM, Neves JC, Holanda-Pinto SA, Pinto LM, Brito GA, de Andrade GM.** Vitamin E does not prevent bone loss and induced anxiety in rats with ligature-induced periodontitis. *Arch Oral Biol* **2013**; 58(1):50-58.

134. **Pei YH, Chen J, Xie L, Cai XM, Yang RH, Wang X, Gong JB.** Hydroxytyrosol Protects against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury through a PI3K/Akt-Dependent Mechanism. *Mediators Inflamm* **2016**; 2016:1232103.
135. **Pirozzi C, Lama A, Simeoli R, Paciello O, Pagano TB, Mollica MP, Di Guida F, Russo R, Magliocca S, Canani RB, Raso GM, Calignano A, Meli R.** Hydroxytyrosol prevents metabolic impairment reducing hepatic inflammation and restoring duodenal integrity in a rat model of NAFLD. *J Nutr Biochem* **2016**; 30:108-115.
136. **Correa MG, Pires PR, Ribeiro FV, Pimentel SZ, Casarin RC, Cirano FR, Tenenbaum HT, Casati MZ.** Systemic treatment with resveratrol and/or curcumin reduces the progression of experimental periodontitis in rats. *J Periodontal Res* **2017**; 52(2):201-209.
137. **Lins RD, Figueiredo CR, Queiroz LM, da Silveira EJ, Freitas Rde A.** Immunohistochemical evaluation of the inflammatory response in periodontal disease. *Braz Dent J* **2008**; 19(1):9-14.
138. **Grauballe MC, Bentzen BH, Bjornsson M, Moe D, Jonassen TE, Bendtzen K, Stoltze K, Holmstrup P.** The effect of spironolactone on experimental periodontitis in rats. *J Periodontal Res* **2005**; 40(3):212-217.
139. **Ku SK, Cho HR, Sung YS, Kang SJ, Lee YJ.** Effects of calcium gluconate on experimental periodontitis and alveolar bone loss in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **2011**; 108(4):241-250.
140. **Kara A, Akman S, Ozkanlar S, Tozoglu U, Kalkan Y, Canakci CF, Tozoglu S.** Immune modulatory and antioxidant effects of melatonin in experimental periodontitis in rats. *Free Radic Biol Med* **2013**; 55:21-26.
141. **Kang SJ, Lee EK, Han CH, Lee BH, Lee YJ, Ku SK.** Inhibitory effects of *Persicariae Rhizoma* aqueous extracts on experimental periodontitis and alveolar bone loss in Sprague-Dawley rats. *Exp Ther Med* **2016**; 12(3):1563-1571.
142. **Canbakan B, Senturk H, Tahan V, Hatemi I, Balci H, Toptas T, Sonsuz A, Velet M, Aydin S, Dirican A, Ozgulle S, Ozbay G.** Clinical, biochemical and histological correlations in a group of non-drinker subjects with non-alcoholic fatty liver disease. *Acta Gastroenterol Belg* **2007**; 70(3):277-284.
143. **Wang H, Xue L, Yan R, Zhou Y, Wang MS, Cheng MJ, Hai-Jun H.** Comparison of histologic characteristics of Chinese chronic hepatitis B patients with persistently normal or mildly elevated ALT. *PLoS One* **2013**; 8(11):e80585.
144. **Dalcico R, de Menezes AM, Deocleciano OB, Oria RB, Vale ML, Ribeiro RA, Brito GA.** Protective mechanisms of simvastatin in experimental periodontal disease. *J Periodontol* **2013**; 84(8):1145-1157.
145. **Morita T, Yamazaki Y, Fujiharu C, Ishii T, Seto M, Nishinoue N, Sasaki Y, Kawato T, Motohashi M, Maeno M.** Serum gamma-glutamyltransferase level is associated with periodontal disease independent of drinking habits in Japanese adults. *Med Sci Monit* **2014**; 20:2109-2116.
146. **Franca LFC, Vasconcelos A, da Silva FRP, Alves EHP, Carvalho JS, Lenardo DD, de Souza LKM, Barbosa ALR, Medeiros JR, de Oliveira JS, Vasconcelos DFP.** Periodontitis changes renal structures by oxidative stress and lipid peroxidation. *J Clin Periodontol* **2017**; 44(6):568-576.
147. **Oz HS, Puleo DA.** Animal models for periodontal disease. *J Biomed Biotechnol* **2011**; 2011:754857.
148. **Weinberg MA, Bral M.** Laboratory animal models in periodontology. *J Clin Periodontol* **1999**; 26(6):335-340.
149. **Struillou X, Boutigny H, Soueidan A, Layrolle P.** Experimental animal models in periodontology: a review. *Open Dent J* **2010**; 4:37-47.
150. **Higuchi T, Kinoshita A, Takahashi K, Oda S, Ishikawa I.** Bone regeneration by recombinant human bone morphogenetic protein-2 in rat mandibular defects. An experimental model of defect filling. *J Periodontol* **1999**; 70(9):1026-1031.

151. **Tani-Ishii N, Minamida G, Saitoh D, Chieda K, Omuro H, Sugaya A, Hamada N, Takahashi Y, Kiyohara S, Kashima I, Teranaka T, Umemotot T.** Inhibitory effects of incadronate on the progression of rat experimental periodontitis by porphyromonas gingivalis infection. *J Periodontol* **2003**; 74(5):603-609.
152. **Polak D, Wilensky A, Shapira L, Halabi A, Goldstein D, Weiss EI, Hour-Haddad Y.** Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response. *J Clin Periodontol* **2009**; 36(5):406-410.
153. **Rogers JE, Li F, Coatney DD, Rossa C, Bronson P, Krieder JM, Giannobile WV, Kirkwood KL.** Actinobacillus actinomycetemcomitans lipopolysaccharide-mediated experimental bone loss model for aggressive periodontitis. *J Periodontol* **2007**; 78(3):550-558.
154. **Bain JL, Lester SR, Henry WD, Bishop CM, Turnage AA, Naftel JP, Johnson RB.** Comparative gender differences in local and systemic concentrations of pro-inflammatory cytokines in rats with experimental periodontitis. *J Periodontol Res* **2009**; 44(1):133-140.
155. **Lohinai Z, Benedek P, Feher E, Gyorfi A, Rosivall L, Fazekas A, Salzman AL, Szabo C.** Protective effects of mercaptoethylguanidine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase, in ligature-induced periodontitis in the rat. *Br J Pharmacol* **1998**; 123(3):353-360.
156. **Kuhr A, Popa-Wagner A, Schmoll H, Schwahn C, Kocher T.** Observations on experimental marginal periodontitis in rats. *J Periodontol Res* **2004**; 39(2):101-106.
157. **Leitao RF, Ribeiro RA, Chaves HV, Rocha FA, Lima V, Brito GA.** Nitric oxide synthase inhibition prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol* **2005**; 76(6):956-963.
158. **Di Paola D, Price GB, Zannis-Hadjopoulos M.** Differentially active origins of DNA replication in tumor versus normal cells. *Cancer Res* **2006**; 66(10):5094-5103.
159. **Andersen UL, Sabuncu M, Filip R, Leuchs G.** Experimental demonstration of coherent state estimation with minimal disturbance. *Phys Rev Lett* **2006**; 96(2):020409.
160. **Tomofuji T, Ekuni D, Irie K, Azuma T, Endo Y, Tamaki N, Sanbe T, Murakami J, Yamamoto T, Morita M.** Preventive effects of a cocoa-enriched diet on gingival oxidative stress in experimental periodontitis. *J Periodontol* **2009**; 80(11):1799-1808.
161. **Kirzioglu FY, Tozum Bulut M, Dogan B, Fentoglu O, Ozmen O, Carsancakli SA, Ergun AG, Ozdem M, Orhan H.** Anti-inflammatory effect of rosuvastatin decreases alveolar bone loss in experimental periodontitis. *J Oral Sci* **2017**; 59(2):247-255.
162. **Yagan A, Kesim S, Liman N.** Effect of low-dose doxycycline on serum oxidative status, gingival antioxidant levels, and alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol* **2014**; 85(3):478-489.
163. **Goes P, Lima NA, Rodrigues JA, Benevides NM, Brito GA, Lima V.** Anti-inflammatory and Anti-resorptive Effects of Atorvastatin on Alveolar Bone Loss in Wistar Rats. *Braz Dent J* **2016**; 27(3):267-272.
164. **Semenoff TA, Semenoff-Segundo A, Bosco AF, Nagata MJ, Garcia VG, Biasoli ER.** Histometric analysis of ligature-induced periodontitis in rats: a comparison of histological section planes. *J Appl Oral Sci* **2008**; 16(4):251-256.
165. **Li X, Wu X, Ma Y, Hao Z, Chen S, Fu T, Chen H, Wang H.** Oral administration of 5-hydroxytryptophan aggravated periodontitis-induced alveolar bone loss in rats. *Arch Oral Biol* **2015**; 60(5):789-798.
166. **Bezerra MM, de Lima V, Alencar VB, Vieira IB, Brito GA, Ribeiro RA, Rocha FA.** Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol* **2000**; 71(6):1009-1014.
167. **Toker H, Ozdemir H, Eren K, Ozer H, Sahin G.** N-acetylcysteine, a thiol antioxidant, decreases alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol* **2009**; 80(4):672-678.

168. **Cluis CP, Burja AM, Martin VJ.** Current prospects for the production of coenzyme Q10 in microbes. *Trends Biotechnol* **2007**; 25(11):514-521.
169. **Kim DO, Lee KW, Lee HJ, Lee CY.** Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *J Agric Food Chem* **2002**; 50(13):3713-3717.
170. **Dar A, Faizi S, Naqvi S, Roome T, Zikr-ur-Rehman S, Ali M, Firdous S, Moin ST.** Analgesic and antioxidant activity of mangiferin and its derivatives: the structure activity relationship. *Biol Pharm Bull* **2005**; 28(4):596-600.
171. **Lockyer S, Corona G, Yaqoob P, Spencer JP, Rowland I.** Secoiridoids delivered as olive leaf extract induce acute improvements in human vascular function and reduction of an inflammatory cytokine: a randomised, double-blind, placebo-controlled, cross-over trial. *Br J Nutr* **2015**; 114(1):75-83.
172. **Mnafgui K, Hajji R, Derbali F, Khlif I, Kraiem F, Ellefi H, Elfeki A, Allouche N, Gharsallah N.** Protective Effect of Hydroxytyrosol Against Cardiac Remodeling After Isoproterenol-Induced Myocardial Infarction in Rat. *Cardiovasc Toxicol* **2016**; 16(2):147-155.
173. **Merra E, Calzaretti G, Bobba A, Storelli MM, Casalino E.** Antioxidant role of hydroxytyrosol on oxidative stress in cadmium-intoxicated rats: different effect in spleen and testes. *Drug Chem Toxicol* **2014**; 37(4):420-426.
174. **Dolan LC, Hofman-Huther H, Amann N.** Hydroxytyrosol: lack of clastogenicity in a bone marrow chromosome aberration study in rats. *BMC Res Notes* **2014**; 7:923.
175. **Brock GR, Butterworth CJ, Matthews JB, Chapple IL.** Local and systemic total antioxidant capacity in periodontitis and health. *J Clin Periodontol* **2004**; 31(7):515-521.
176. **Akalin FA, Baltacioglu E, Alver A, Karabulut E.** Total antioxidant capacity and superoxide dismutase activity levels in serum and gingival crevicular fluid in pregnant women with chronic periodontitis. *J Periodontol* **2009**; 80(3):457-467.
177. **Battino M, Ferreiro MS, Gallardo I, Newman HN, Bullon P.** The antioxidant capacity of saliva. *J Clin Periodontol* **2002**; 29(3):189-194.
178. **Takane M, Sugano N, Ezawa T, Uchiyama T, Ito K.** A marker of oxidative stress in saliva: association with periodontally-involved teeth of a hopeless prognosis. *J Oral Sci* **2005**; 47(1):53-57.
179. **Wei D, Zhang XL, Wang YZ, Yang CX, Chen G.** Lipid peroxidation levels, total oxidant status and superoxide dismutase in serum, saliva and gingival crevicular fluid in chronic periodontitis patients before and after periodontal therapy. *Aust Dent J* **2010**; 55(1):70-78.
180. **Borges I, Jr., Moreira EA, Filho DW, de Oliveira TB, da Silva MB, Frode TS.** Proinflammatory and oxidative stress markers in patients with periodontal disease. *Mediators Inflamm* **2007**; 2007:45794.
181. **Vasconcelos DF, Pereira da Silva FR, Pinto ME, Santana LA, Souza IG, Miranda de Souza LK, Oliveira NC, Ventura CA, Novaes PD, Barbosa AL, Medeiros JR, Mikolasevic I, Mani A, Soares de Oliveira J.** Decrease of Pericytes is Associated With Liver Disease Caused by Ligature-Induced Periodontitis in Rats. *J Periodontol* **2017**; 88(2):e49-e57.
182. **El-Shinnawi U, Soory M.** Actions of Adjunctive Nutritional Antioxidants in Periodontitis and Prevalent Systemic Inflammatory Diseases. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* **2015**; 15(4):261-276.
183. **Saglam E, Canakci CF, Sebin SO, Saruhan N, Ingec M, Canakci H, Sezer U.** Evaluation of Oxidative Status in Patients With Chronic Periodontitis and Polycystic Ovary Syndrome: A Cross-Sectional Study. *J Periodontol* **2017**:1-16.
184. **Akalin FA, Baltacioglu E, Alver A, Karabulut E.** Lipid peroxidation levels and total oxidant status in serum, saliva and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* **2007**; 34(7):558-565.

185. **Gupta Madhur CS, Kolte Abhay, Chandankhede Manju,** Malondialdehyde levels in patients with chronic periodontitis. *Journal of Evolution of Medical and Dental sciences* **2013**; 2:4325-4328.
186. **Baltacioglu E, Yuva P, Aydin G, Alver A, Kahraman C, Karabulut E, Akalin FA.** Lipid peroxidation levels and total oxidant/antioxidant status in serum and saliva from patients with chronic and aggressive periodontitis. Oxidative stress index: a new biomarker for periodontal disease? *J Periodontol* **2014**; 85(10):1432-1441.
187. **Ghallab NA, Hamdy E, Shaker OG.** Malondialdehyde, superoxide dismutase and melatonin levels in GCF of aggressive and chronic periodontitis patients. *Aust Dent J* **2015**.
188. **Li L, Du J, Lian Y, Zhang Y, Li X, Liu Y, Zou L, Wu T.** Protective Effects of Coenzyme Q10 Against Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress in PC12 Cell: The Role of Nrf2 and Antioxidant Enzymes. *Cell Mol Neurobiol* **2016**; 36(1):103-111.
189. **Erol B, Sari U, Amasyali AS, Ozkanli S, Sogut S, Hanci V, Efiloglu O, Danacioglu YO, Engin P, Yencilek F, Atis G, Yildirim A, Alkoc OA, Caskurlu T.** Comparison of combined antioxidants and thymoquinone in the prevention of testis ischemia - reperfusion injury. *Andrology* **2017**; 5(1):119-124.
190. **Huyut Z, Sekeroglu MR, Balahoroglu R, Huyut MT.** Characteristics of resveratrol and serotonin on antioxidant capacity and susceptibility to oxidation of red blood cells in stored human blood in a time-dependent manner. *J Int Med Res* **2017**:300060517725450.
191. **Wang XL, Li T, Li JH, Miao SY, Xiao XZ.** The Effects of Resveratrol on Inflammation and Oxidative Stress in a Rat Model of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Molecules* **2017**; 22(9).
192. **Tas U, Ayan M, Sogut E, Kuloglu T, Uysal M, Tanriverdi HI, Senel U, Ozyurt B, Sarsilmaz M.** Protective effects of thymoquinone and melatonin on intestinal ischemia-reperfusion injury. *Saudi J Gastroenterol* **2015**; 21(5):284-289.
193. **Gul M, Ayan M, Seydanoglu A, Cander B, Girisgin S, Erayman I, Erdem S.** The effect of N-acetyl cysteine on serum glutathione, TNF-alpha and tissue malondialdehyde levels in the treatment of sepsis. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg* **2011**; 17(4):293-297.
194. **Tulunoglu O, Alacam A, Bastug M, Yavuzer S.** Superoxide dismutase activity in healthy and inflamed pulp tissues of permanent teeth in children. *J Clin Pediatr Dent* **1998**; 22(4):341-345.
195. **Aziz AS, Kalekar MG, Suryakar AN, Benjamin T, Prakashan MJ, Ahmed BM, Sayyad M.** Assessment of some biochemical oxidative stress markers in male smokers with chronic periodontitis. *Indian J Clin Biochem* **2013**; 28(4):374-380.
196. **Baltacioglu E, Akalin FA, Alver A, Balaban F, Unsal M, Karabulut E.** Total antioxidant capacity and superoxide dismutase activity levels in serum and gingival crevicular fluid in post-menopausal women with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* **2006**; 33(6):385-392.
197. **Canakci V, Yildirim A, Canakci CF, Eltas A, Cicek Y, Canakci H.** Total antioxidant capacity and antioxidant enzymes in serum, saliva, and gingival crevicular fluid of preeclamptic women with and without periodontal disease. *J Periodontol* **2007**; 78(8):1602-1611.
198. **Safaei F, Mehrzadi S, Khadem Haghghian H, Hosseinzadeh A, Nesari A, Dolatshahi M, Esmailizadeh M, Goudarzi M.** Protective effects of gallic acid against methotrexate-induced toxicity in rats. *Acta Chir Belg* **2017**:1-9.
199. **Di Giancamillo A, Rossi R, Pastorelli G, Deponti D, Carollo V, Casamassima D, Domeneghini C, Corino C.** The effects of dietary verbascoside on blood and liver oxidative stress status induced by a high n-6 polyunsaturated fatty acids diet in piglets. *J Anim Sci* **2015**; 93(6):2849-2859.
200. **Sakallioglu U, Aliyev E, Eren Z, Aksimsek G, Keskiner I, Yavuz U.** Reactive oxygen species scavenging activity during periodontal mucoperiosteal healing: an experimental study in dogs. *Arch Oral Biol* **2005**; 50(12):1040-1046.

201. **Patel SP, Pradeep AR, Chowdhry S.** Crevicular fluid levels of plasma glutathione peroxidase (eGPx) in periodontal health and disease. *Arch Oral Biol* **2009**; 54(6):543-548.
202. **Patel SP, Rao NS, Pradeep AR.** Effect of nonsurgical periodontal therapy on crevicular fluid and serum glutathione peroxidase levels. *Dis Markers* **2012**; 32(1):1-7.
203. **Chahbouni M, Lopez MDS, Molina-Carballo A, de Haro T, Munoz-Hoyos A, Fernandez-Ortiz M, Guerra-Librero A, Acuna-Castroviejo D.** Melatonin Treatment Reduces Oxidative Damage and Normalizes Plasma Pro-Inflammatory Cytokines in Patients Suffering from Charcot-Marie-Tooth Neuropathy: A Pilot Study in Three Children. *Molecules* **2017**; 22(10).
204. **Karakan NC, Akpınar A, Goze F, Poyraz O.** Investigating the Effects of Systemically Administered Strontium Ranelate on Alveolar Bone Loss Histomorphometrically and Histopathologically on Experimental Periodontitis in Rats. *J Periodontol* **2017**; 88(2):e24-e31.
205. **Bedini R, Meleo D, Pecci R, Pacifici L.** The use of microtomography in bone tissue and biomaterial three-dimensional analysis. *Ann Ist Super Sanita* **2009**; 45(2):178-184.
206. **Burckhardt JJ, Gaegauf-Zollinger R, Guggenheim B.** Development of immunological sensitization and alveolar bone loss in gnotobiotic rats infected with *Actinomyces viscosus* Ny 1. *J Periodontol Res* **1981**; 16(2):147-158.
207. **Evans RT, Klausen B, Sojar HT, Bedi GS, Sfintescu C, Ramamurthy NS, Golub LM, Genco RJ.** Immunization with *Porphyromonas* (*Bacteroides*) *gingivalis* fimbriae protects against periodontal destruction. *Infect Immun* **1992**; 60(7):2926-2935.
208. **Saglam M, Koseoglu S, Hatipoglu M, Esen HH, Koksall E.** Effect of sumac extract on serum oxidative status, RANKL/OPG system and alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J Appl Oral Sci* **2015**; 23(1):33-41.
209. **Baek KH, Oh KW, Lee WY, Lee SS, Kim MK, Kwon HS, Rhee EJ, Han JH, Song KH, Cha BY, Lee KW, Kang MI.** Association of oxidative stress with postmenopausal osteoporosis and the effects of hydrogen peroxide on osteoclast formation in human bone marrow cell cultures. *Calcif Tissue Int* **2010**; 87(3):226-235.
210. **Lee NK, Choi YG, Baik JY, Han SY, Jeong DW, Bae YS, Kim N, Lee SY.** A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation. *Blood* **2005**; 106(3):852-859.
211. **Allam E, Draz A, Hassan A, Neamat A, Galal M, Windsor LJ.** Expression of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand in ligature-induced periodontitis in osteoporotic and non-osteoporotic rats. *J Periodontol Res* **2010**; 45(1):136-142.
212. **Bonewald LF.** The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res* **2011**; 26(2):229-238.
213. **Tang H, Mattheos N, Yao Y, Jia Y, Ma L, Gong P.** In vivo osteoprotegerin gene therapy preventing bone loss induced by periodontitis. *J Periodontol Res* **2015**; 50(4):434-443.
214. **Belibasakis GN, Bostanci N.** The RANKL-OPG system in clinical periodontology. *J Clin Periodontol* **2012**; 39(3):239-248.
215. **Zhou T, Chen D, Li Q, Sun X, Song Y, Wang C.** Curcumin inhibits inflammatory response and bone loss during experimental periodontitis in rats. *Acta Odontol Scand* **2013**; 71(2):349-356.
216. **De Almeida J, Ervolino E, Bonfietti LH, Novaes VC, Theodoro LH, Fernandes LA, Martins TM, Faleiros PL, Garcia VG.** Adjuvant Therapy With Sodium Alendronate for the Treatment of Experimental Periodontitis in Rats. *J Periodontol* **2015**; 86(10):1166-1175.
217. **Chen H, Fu T, Ma Y, Wu X, Li X, Li X, Shen J, Wang H.** Intermittent administration of parathyroid hormone ameliorated alveolar bone loss in experimental periodontitis in streptozotocin-induced diabetic rats. *Arch Oral Biol* **2017**; 83:76-84.
218. **Arabaci T, Kermen E, Ozkanlar S, Kose O, Kara A, Kizildag A, Duman SB, Ibisoglu E.** Therapeutic Effects of Melatonin on Alveolar Bone Resorption After Experimental Periodontitis in Rats: A Biochemical and Immunohistochemical Study. *J Periodontol* **2015**; 86(7):874-881.

219. **Ribeiro FV, Pino DS, Franck FC, Benatti BB, Tenenbaum H, Davies JE, Pimentel SP, Casarin RC, Cirano FR, Casati MZ.** Resveratrol Inhibits Periodontitis-Related Bone Loss in Rats Subjected to Cigarette Smoke Inhalation. *J Periodontol* **2017**; 88(8):788-798.
220. **Fedchenko N, Reifenrath J.** Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry analysis results in the bone tissue - a review. *Diagn Pathol* **2014**; 9:221.
221. **Li L, Sapkota M, Kim SW, Soh Y.** Herbacetin inhibits RANKL-mediated osteoclastogenesis in vitro and prevents inflammatory bone loss in vivo. *Eur J Pharmacol* **2016**; 777:17-25.
222. **Lu SH, Chen TH, Chou TC.** Magnolol Inhibits RANKL-induced osteoclast differentiation of raw 264.7 macrophages through heme oxygenase-1-dependent inhibition of NFATc1 expression. *J Nat Prod* **2015**; 78(1):61-68.



8. EKLER

EK 1: Deneysel Hayvanlar Etik Kurul Onay Belgesi.

T.C.

ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ

Hayvan Araştırmaları Yerel Etik Kurulu

Sayı : 64

13./10/2016

Konu : Koranlar

| BAŞVURU BİLGİLERİ (APPLICATION INFORMATION) | ARAŞTIRMANIN ADI (TITLE OF THE PROJECT) | Deneysel Periodontitis Oluşturulan Sıçanlarda Hidroksitirozol'un Alveolar Kemik Yıkımı ve Oksidatif Stres Parametrelerine Olan Etkisi |
|------------------------------------------------|-------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | SORUMLU ARAŞTIRMACI (PRINCIPAL INVESTIGATOR) | Yrd.Doç. Dr. Şadiye ÇOŞKUNER |
| | DİĞER ARAŞTIRMACILAR (OTHER INVESTIGATORS) | Arş. Gör. Mehmet Cihan ŞENGÜN, Doç. Dr. Buket KIN TEKCE |
| | ARAŞTIRMA MERKEZİ (RESEARCH CENTER) | A.İ.B.Ü Deneysel Hayvanlar Uygulama ve Araştırma Merkezi |

| KARAR (DECISION) | Karar no (Decision No): 2016/41 | Tarih (Date): 12.10.2016 |
|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| | Doç.Dr.Şadiye ÇOŞKUNER'in sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma dosyası ve ilgili belgelerin incelenmesi sonucunda araştırmanın gerçekleştirilmesinde etik yönden sakınca olmadığına mevcudun oy birliği/oy çokluğu ile karar verilmiştir. | |

| Üyeler | Uzmanlık Alanı | Kurumu | İmza |
|--------------------------------------------------------|------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|------|
| Prof. Dr. Aysel KÜKNER (Başkan) | Histoloji ve Embriyoloji AD. Öğretim Üyesi | AİBÜ Tıp Fakültesi | |
| Prof. Dr. Erol AYAZ (Üye) | Tıbbi Parazitoloji AD Öğretim Üyesi | AİBÜ Tıp Fakültesi | |
| Prof. Dr. Hamit COŞKUN (Üye) | Psikoloji Bölümü Öğretim Üyesi | AİBÜ Fen Edebiyat Fakültesi | |
| Prof. Dr. Neriman ŞENGÜL (Invivo Üye) | Genel Cer. AD Öğretim Üyesi | AİBÜ Tıp Fakültesi | |
| Doç. Dr. Ali Rıza GEZİCİ (Üye) | Beyin Cer. AD Öğretim Üyesi | AİBÜ Tıp Fakültesi | |
| Doç. Dr. Fatih ULAŞ (Üye) | Göz Hastalıkları AD Öğretim Üyesi | AİBÜ Tıp Fakültesi | |
| Doç. Dr. Yeşim YENER (Üye) | İlköğretim Bölümü Öğretim Üyesi | AİBÜ Eğitim Fakültesi | |
| Yrd. Doç. Dr. Serdar GÖZÜTOK (Üye) | Yaban Hayatı ve Ekolojisi Bölümü Öğretim Üyesi | AİBÜ Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi | |
| Yrd. Doç. Dr. Eray KEMAHLI (Üye) | Üroloji AD Öğretim Üyesi | AİBÜ Tıp Fakültesi | |
| Doç. Dr. Mustafa ŞİT (Üye) | Genel Cer. AD Öğretim Üyesi | AİBÜ Tıp Fakültesi | |
| Doç. Dr. Orçun TOPTAŞ (Üye) | Cerrahi AD Öğretim Üyesi | AİBÜ Diş Hek. Fakültesi | |
| Vet. Hek. Ayhan ÇETİNKAYA (Sorumlu Veteriner Hekim) | Veteriner Hekim | AİBÜ Deneysel Hayvanlar Uygulama. ve Araştırma Merkezi | |
| Vet. Hek. Orhan BULUT (TC Üyesi) | Veteriner Hekim | BOLCA Hindi /BOLU | |
| Av. Cihan KARAGÖZ (Sivil Toplum Kuruluşu üyesi) | Avukat | Tabaklar Mahallesi Hürriyet cad.No.47/7Merkez/ BOLU | |

9. ÖZGEÇMİŞ

Mehmet Cihan ŞENGÜN 03.11.1990 tarihinde İzmir’de doğdu. 2009 yılında girdiği Başkent Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesinden 2014 yılında mezun oldu. 2014 yılında Abant İzzet Baysal Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı’nda uzmanlık eğitimine başladı. O tarihten itibaren aynı bölümde araştırma görevlisi olarak çalışmakta ve uzmanlık öğrenimine devam etmektedir.

