

**NEBİ CANSIN
KARAKAN**

**RATLARDA OLUŞTURULAN DENEYSEL PERİODONTİTİS MODELİNDE
SİSTEMİK OLARAK UYGULANAN STRONSYUM RANELATIN ALVEOLER
KEMİK REZORPSİYONU ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN HİSTOMORFOMETRİK**

**CÜDHF
SİVAS
2015**



**T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ**

**RATLARDA OLUŞTURULAN DENEYSSEL PERİODONTİTİS
MODELİNDE SİSTEMİK OLARAK UYGULANAN STRONSIYUM
RANELATIN ALVEOLER KEMİK REZORPSİYONU
ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN HİSTOMORFOMETRİK VE
HİSTOPATOLOJİK AÇIDAN ARAŞTIRILMASI**

DT. NEBİ CANSIN KARAKAN

**UZMANLIK TEZİ
PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI**

SİVAS-2015

**T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ**

**RATLARDA OLUŞTURULAN DENEYSEL PERİODONTİTİS
MODELİNDE SİSTEMİK OLARAK UYGULANAN STRONSIYUM
RANELATIN ALVEOLER KEMİK REZORPSİYONU
ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN HİSTOMORFOMETRİK VE
HİSTOPATOLOJİK AÇIDAN ARAŞTIRILMASI**




DT. NEBİ CANSIN KARAKAN

**UZMANLIK TEZİ
PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
YRD. DOÇ. DR. AYSUN AKPINAR**

SİVAS-2015

“Ratlarda Oluşturulan Deneysel Periodontitis Modelinde Sistemik Olarak Uygulanan Stronsiyum Ranelatın Alveoler Kemik Rezorpsiyonu Üzerindeki Etkisinin Histomorfometrik ve Histopatolojik Açıdan Araştırılması” adlı **Uzmanlık** Tezi, jürimiz tarafından Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalında **Uzmanlık** tezi olarak kabul edilmiştir.

| | AD SOYAD | İMZA |
|--------|-----------------------------|---|
| Başkan | Prof. Dr. Hülya TOKER |  |
| Üye | Doç. Dr. Serhat DEMİRER |  |
| Üye | Yrd. Doç. Dr. Aysun AKPINAR |  |

ONAY

Bu tez çalışması, 27.10.2015 tarihinde Fakülte Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Sami HİZMETLİ
Dİş HEKİMLİğİ FAKÜLTESİ
DEKANI

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 18.02.2015 tarihli ve 4/4 sayılı kararı ile kabul edilen Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna göre hazırlanmıştır.

ÖZET

RATLARDA OLUŞTURULAN DENEYSEL PERİODONTİTİS MODELİNDE SİSTEMİK OLARAK UYGULANAN STRONSIYUM RANELATIN ALVEOLER KEMİK REZORPSİYONU ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN HİSTOMORFOMETRİK VE HİSTOPATOLOJİK AÇIDAN ARAŞTIRILMASI

Nebi Cansın KARAKAN

Uzmanlık Tezi

Periodontoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Aysun AKPINAR

2015, 63 sayfa

Bu çalışmanın amacı, ratlarda oluşturulan deneysel periodontitis modelinde sistemik olarak uygulanan SR (stronsiyum ranelat) 'nin alveoler kemik rezorpsiyonu üzerindeki etkisinin histomorfometrik ve histopatolojik açıdan araştırılmasıdır.

40 Wistar rat rastgele olarak 5 gruba ayrıldı: Kontrol (n=8) grubu; ligatür (n=8) grubu; 300 mg/kg stronsiyum ranelat (SR300, n=8) grubu; 625 mg/kg stronsiyum ranelat (SR625, n=8) grubu; 900 mg/kg stronsiyum ranelat (SR900, n=8). Deneysel periodontitis oluşturmak için ratların sağ mandibular 1. molar dişlerine 4/0 ipek ligatürler submarjinal olarak yerleştirildi. 11 günlük SR uygulamaları sonrasında tüm ratlar sakrifiye edildi. Alveoler kemik kaybı, stereomikroskopta fotoğraflar alındıktan sonra mine-sement sınırı ile alveoler kret tepesi arasındaki uzaklıklar ölçülerek hesaplandı. Serum interlökin (IL)-1 β , osteoprotegerin (OPG) ve kemik spesifik alkalen fosfataz (BALP) düzeyleri enzim bağlı immünosorbent analizi (ELİZA) ile saptandı. Histopatolojik olarak enflamatuvar hücre infiltrasyonu, osteoblast ve osteoklast sayıları belirlendi. İmmünohistokimyasal olarak nükleer faktör kappa B'nin reseptör aktivatör bağlayıcısı (RANKL) aktiviteleri değerlendirildi.

Çalışma sonuçlarına göre alveoler kemik kaybı SR900 grubunda ligatür grubuna göre anlamlı olarak daha az bulundu ($p<0.05$). Kontrol grubuna göre diğer tüm

gruplarda anlamlı olarak daha çok kemik kaybı gözlemlendi ($p<0.05$). Ligatür, SR 300 ve SR625 grupları arasında ise alveoler kemik kaybı bakımından fark bulunmadı ($p>0.05$). Ligatür grubundaki osteoklast sayısının, kontrol, SR300 ve SR900 gruplarına göre önemli ölçüde daha yüksek olduğu tespit edildi ($p<0.05$). Osteoblast sayıları değerlendirildiğinde, ligatür, SR625 ve SR900 gruplarında, kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha fazla osteoblast saptandı ($p<0.05$). SR625 grubunun osteoblast sayıları değerlendirildiğinde SR300 grubundan anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p<0.05$). Enflamatuvar infiltrat skorları değerlendirildiğinde, kontrol grubundaki enflamatuvar infiltrasyon, diğer tüm gruplara göre anlamlı olarak daha düşük bulundu ($p<0.05$). RANKL aktiviteleri değerlendirildiğinde ligatür, SR300 ve SR625 gruplarının RANKL aktivitesi kontrol grubundan anlamlı olarak daha yüksek bulunurken ($p<0.05$), kontrol ile SR900 grupları arasında fark görülmedi ($p>0.05$). Serum IL-1 β , OPG ve BALP düzeyleri değerlendirildiğinde, bu parametreler bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p>0.05$).

Çalışmamızda elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde; SR'nin azalan RANKL aktivitesi ve osteoklast sayısı ile birlikte alveoler kemik yıkımını azaltabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Stronsiyum ranelat, deneysel periodontitis, enflamatuvar sitokinler, kemik spesifik alkalen fosfataz, osteoprotegerin, nükleer faktör kapp B ligandı

ABSTRACT

INVESTIGATING THE EFFECTS OF SYSTEMICALLY ADMINISTIERED STRONTIUM RANELATE ON ALVEOLAR BONE LOSS HISTOMORPHOMETRICALLY AND HISTOPATHOLOGICALLY ON EXPERIMENTAL PERIODONTITIS IN RATS

Nebi Cansın KARAKAN

Expertise Thesis

Department of Periodontology

Supervisor: Assoc. Aysun AKPINAR

2015, 63 pages

The aim of this study was to investigate the effects of systemically administered SR (strontium ranelate) on alveolar bone loss histomorphometrically and histopathologically on experimental periodontitis in rats.

Forty Wistar rats were randomly divided into 5 groups: Control (n=8) group; ligated (n=8) group; 300 mg/kg strontium ranelate (SR300, n=8) group; 625 mg/kg strontium ranelate (SR625, n=8) group; 900 mg/kg strontium ranelate (SR900, n=8) group. To create experimental periodontitis 4/0 silk ligatures were inserted submarginally around the first molars at right mandibles of rats. After 11 days of SR administration all rats were sacrificed. Alveolar bone loss was calculated after photographs were taken on stereomicroscope, by measuring enamel-cement junction and alveolar crest distance. Interleukin (IL)-1 β , osteoprotegerin (OPG) and bone specific alkaline phosphatase (BALP) serum levels were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Histopathologically, inflammatory cell infiltration, numbers of osteoblasts and osteoclasts were determined. Immunohistochemically, receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) activities were evaluated.

According to the study results alveolar bone loss was found significantly lower in the SR900 group than in the ligated group ($p < 0.05$). Alveolar bone loss was

significantly higher in all groups than in the control group ($p < 0.05$). Among the ligated, SR300 and SR625 groups no significant difference was detected in respect to alveolar bone loss ($p > 0.05$). Osteoclast numbers in the ligated group were significantly higher than in the control, SR300 and SR900 groups ($p < 0.05$). When osteoblast numbers were evaluated, in the ligature, SR625 and SR900 groups, significantly higher osteoblast numbers were detected than in the control group ($p < 0,05$). According to the osteoblast numbers in the SR625 group, it was found significantly higher than in the SR300 group ($p < 0.05$). When inflammatory infiltration scores were evaluated, inflammatory infiltration in the control group was significantly lower than in all the other groups ($p < 0.05$). According to RANKL activity evaluations, the ligated, SR300 and SR625 groups showed significantly higher values than the control group ($p < 0.05$). According to serum IL-1 β , OPG ve BALP levels, there was no statistically significant difference within these parameters ($p > 0.05$).

In our study when the results were evaluated; it is considered that SR can reduce RANKL activity and osteoclast numbers, as well as alveolar bone loss.

Key Words: Strontium ranelate, experimental periodontitis, inflammatory cytokines, bone spessific alkaline phosphatase, osteoprotegerin, nuclear factor kappa B ligand

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince yardımlarını esirgemeyen, beni destekleyen ve deneyimlerini paylaşan sevgili hocam *Yrd. Doç Dr. Aysun AKPINAR*'a

Tez çalışmamda histopatolojik ve immünohistokimyasal değerlendirmelerde yardımlarından dolayı *Prof. Dr. Fahrettin GÖZE*'ye,

Tez çalışmamda ELISA analizlerini gerçekleştiren *Prof. Dr. Ömer POYRAZ*'a,

Uzmanlık öğrenimim boyunca yanımda olan desteğini esirgemeyen değerli bölüm hocalarım *Prof. Dr. Hülya TOKER*, *Doç. Dr. Hakan DEVELİOĞLU*, *Yrd. Doç. Dr. Vildan BOSTANCI*, *Yrd. Doç. Dr. Hakan ÖZDEMİR*, *Yrd. Doç. Dr. Emine PİRİM GÖRGÜN*'e sevgili arkadaşlarıma ve tüm personele,

Hayatımın her aşamasında beni özveriyle ve içtenlikle destekleyen sevgili babam *Yilkut KARAKAN* ve annem *Duygu KARAKAN*'a

Teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

| | |
|--|-----------|
| İÇ KAPAK..... | i |
| ONAY..... | ii |
| YÖNERGE..... | iii |
| ÖZET | iv |
| ABSTRACT..... | vi |
| TEŞEKKÜR | viii |
| İÇİNDEKİLER DİZİNİ..... | ix |
| ŞEKİLLER DİZİNİ..... | xi |
| ÇİZELGELER DİZİNİ..... | xii |
| SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ | xiii |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER..... | 4 |
| 2.1 Periodontal Hastalık | 4 |
| 2.1.1 Deneysel Periodontitis Modelleri..... | 6 |
| 2.2 Sitokinler | 7 |
| 2.2.1 İnterlökin-1 β (IL-1 β)..... | 9 |
| 2.3 Osteoprotegerin (OPG) | 9 |
| 2.4 Nükleer Faktör Kappa B'nin Reseptör Aktivatör Bağlayıcısı (RANKL)..... | 10 |
| 2.5 Kemik Spesifik Alkalen Fosfataz (BALP)..... | 12 |
| 2.6 Bifosfonatların Periodontolojide Kullanımı..... | 12 |
| 2.7 Stronsiyum Ranelat (SR)..... | 15 |
| 2.7.1 SR'nin Kimyasal Yapısı ve Biyolojik Etkileri | 15 |
| 2.7.2 SR'nin Kemik Dokusuna Etkileri | 17 |
| 2.7.3 SR'nin Anti-enflamatuvar Etkileri | 18 |
| 2.7.4 SR'nin Farmakokinetik Özellikleri..... | 18 |
| 2.7.5 SR'nin Yan Etkileri | 19 |
| 3. GEREÇ ve YÖNTEM | 21 |
| 3.1 Çalışma Grupları | 21 |
| 3.2 Çalışma Prosedürü | 22 |
| 3.2.1 Deneysel Periodontitis Oluşturulması..... | 22 |
| 3.2.2 SR Uygulaması..... | 23 |
| 3.2.3 Sakrifikasyon..... | 23 |
| 3.2.4 Ratlardan Serum Elde Edilmesi | 23 |
| 3.2.5 Morfometrik Değerlendirme | 23 |
| 3.2.6 Histopatolojik İşlemler..... | 24 |

| | |
|--|-----------|
| 3.2.7 IL-1 β ELISA Kitinin Hazırlanması..... | 25 |
| 3.2.8 OPG ELISA Kitinin Hazırlanması..... | 26 |
| 3.2.9 BALP ELISA Kitinin Hazırlanması..... | 27 |
| 3.2.10 İstatistiksel Değerlendirme..... | 28 |
| 4. BULGULAR..... | 29 |
| 4.1 Morfometrik Ölçümler..... | 29 |
| 4.2 Histopatolojik Değerlendirmeler..... | 32 |
| 4.3 İmmünohistokimyasal Analizler..... | 37 |
| 4.4 Biyokimyasal Analizler..... | 39 |
| 4.4.1 IL-1 β Düzeyi..... | 39 |
| 4.4.2 OPG Düzeyi..... | 40 |
| 4.4.3 BALP Düzeyi..... | 41 |
| 5. TARTIŞMA..... | 42 |
| 6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER..... | 49 |
| 7. KAYNAKLAR..... | 50 |
| İZİNLER..... | 62 |
| EK 1. Cumhuriyet Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı | |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 63 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | <u>Sayfa No</u> |
|---|------------------------|
| Şekil 2.1 Osteoklast farklılaşmasında OPG, RANK ve RANKL'ın rolü | 11 |
| Şekil 2.2 OPG, RANK ve RANKL ilişkisi | 12 |
| Şekil 2.3 SR'nin kimyasal yapısı | 16 |
| Şekil 3.1 Çalışma dizaynı şeması | 22 |
| Şekil 4.1 Gruplara ait alveoler kemik kaybı ortalamaları (μm) | 29 |
| Şekil 4.2 Gruplara ait sağ alt 1. molar dişlerin stereomikroskop görüntüsü | 31 |
| Şekil 4.3 Gruplara ait osteoklast sayısı dağılımı (n) | 32 |
| Şekil 4.4 Gruplara ait osteoblast sayısı dağılımı (n) | 33 |
| Şekil 4.5 Gruplara ait histolojik kesitler | 34 |
| Şekil 4.6 Gruplardaki enflamatuvar hücre infiltratı dağılımı (%) | 36 |
| Şekil 4.7 Enflamatuar hücre infiltratı alanı | 36 |
| Şekil 4.8 Gruplara ait RANKL aktivitesi dağılımı (%) | 37 |
| Şekil 4.9 Gruplara ait RANKL immünohistokimyasal boyama görüntüleri | 38 |
| Şekil 4.10 Gruplara ait serum IL-1 β dağılımı (pg/ml) | 39 |
| Şekil 4.11 Gruplara ait serum OPG dağılımı (ng/ml) | 40 |
| Şekil 4.12 Gruplara ait serum BALP dağılımı (ng/ml) | 41 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | <u>Sayfa No</u> |
|--|------------------------|
| Çizelge 4.1 Gruplara ait alveoler kemik kaybı düzeyleri (μm) | 30 |
| Çizelge 4.2 Gruplara ait serum IL-1 β düzeyleri (pg/ml) | 39 |
| Çizelge 4.3 Gruplara ait serum OPG düzeyleri (ng/ml) | 40 |
| Çizelge 4.4 Gruplara ait serum BALP düzeyleri (ng/ml) | 41 |

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|-------------------------|--|
| ALP | Alkalen fosfataz |
| BALP | Kemik spesifik alkalen fosfataz |
| BMD | Kemik mineral yoğunluğu |
| CaSR | Kalsiyum duyarlı reseptör |
| DRESS | Eozinofili ve sistemik semptomlarla birlikte görülen ilaç yan etkisi |
| ELİZA | Enzim bağlı immünosorbent analizi |
| IFN | İnterferon |
| IL | İnterlökin |
| mRNA | Mesajcı ribonükleik asit |
| OPG | Osteoprotegerin |
| PMNL | Polimorf nükleer lökosit |
| RANK | Nükleer faktör kappa B'nin reseptör aktivatörü |
| RANKL | Nükleer faktör kappa B'nin reseptör aktivatör bağlayıcısı |
| SR | Stronsiyum ranelat |
| Sr²⁺⁺ | İki değerli stronsiyum katyonu |
| Th1 | Yardımcı T-1 hücresi |
| Th2 | Yardımcı T-2 hücresi |
| TNF | Tümör nekroz faktör |

1. GİRİŞ

Periodontitis, periodontopatojenlere karşı konak enflamatuvar ve immünolojik yanıtın görüldüğü, bağ dokusu ataşmanı ve alveoler kemik kaybıyla karakterize olan, diş destek dokularının kronik, enfeksiyöz ve multifaktöriyel bir hastalığıdır [1]. Periodontitiste genellikle aktif ve pasif dönemler birbirini takip eder [2, 3].

Periodontitisin etiyojisinde birçok faktörden söz edilmesine rağmen temel olarak hastalığın oluşumuna neden olan etken mikrobiyal dental plak olarak tanımlanmaktadır [4]. Periodontal hastalıklarda mikrobiyal dental plağın içeriği supragingival ve subgingival olarak farklı bakteri türlerini içermektedir [5]. Oral bakteriyel mikrobiota 700'den fazla filotipten oluşmaktadır ve bunların yaklaşık 400'ü subgingival plakta yer almaktadır [6, 7]. Subgingival floranın bu kadar zengin olmasına rağmen hastalığa neden olan birçok spesifik tür bulunmaktadır. Derin periodontal ceplerde gram negatif anaerobik çomaklar ve spiroketler yer almaktadır [5]. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Tannerella forsythia*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Treponema denticola* ve spiroketler periodontitis oluşumu ile doğrudan ilişkili bulunmuş ve bu nedenle ana periodontopatojenler olarak adlandırılmışlardır. Periodontopatojenlerin dokularda hastalık oluşturabilmeleri için periodontal dokularda belirli miktarda bulunmaları ve bazı patojenik faktörlere sahip olmaları gerekmektedir. Bununla birlikte mikrobiyal dental plağın içinde bulunan bu mikroorganizmaların hastalık yapabilme düzeyi, konak yanıtına bağlı olarak kişiden kişiye farklılık gösterir. Kısacası hastalığın oluşması için mikrobiyal dental plak temel faktör olmakla birlikte patogenezi açıklamada tek başına yeterli değildir [8]. Periodontitisin oluşması için enflamasyona neden olan faktörlerin belirli miktarlara ulaşarak periodontal dokulara penetre olması gereklidir. Bu faktörlerin en önemlilerinden biri sitokinlerdir. Enflamatuvar yanıt sırasında interlekin (IL)-1 β , IL-6, IL-11, IL-17 ve tümör nekroz faktör- α (TNF- α) gibi pro-enflamatuvar sitokinler kritik konsantrasyonlara ulaşarak osteoblast ve stromal hücrelerdeki osteoprotegerin (OPG) üretimini azaltıp, nükleer faktör kappa B'nin reseptör aktivatör bağlayıcısı (RANKL) üretimini arttırarak osteoklastogenezi indükler; böylece alveoler kemik yıkımını başlatır. Diğer yandan anti-enflamatuvar özellikleri bilinen IL-3, IL-4, IL-10, IL-12, IL-

13, IL-18, interferon- β (IFN- β) ve interferon- γ (IFN- γ) gibi sitokinler tam tersi etki göstererek kemik yıkımını baskırlarlar [9, 10].

Ayrıca diyabet [11], sigara [12], artmış ilaç kullanımına bağlı bozukluklar [13], stres [14], obezite [15], kardiyovasküler hastalıklar [16], modifiye edilebilen risk faktörleri arasında yer alırken, osteoporoz [17], hematolojik bozukluklar [18], konak yanıtı [19], bayanlardaki hormonal değişimler [20] ve hamilelik [21] ise modifiye edilemeyen risk faktörleri arasında yer alır.

IL-1 β , konak immün yanıtında görev alan anahtar mediyatördür ve enflamatuvar hastalıkla birlikte doku yıkımının oluşmasında önemli bir role sahiptir [22]. Temel olarak makrofajlardan salınır [23]. Hastalıklı periodontal dokularda IL-1 β miktarı normale göre daha yüksek düzeyde saptanmıştır [24].

Kemik spesifik alkalen fosfataz (BALP) kemik formasyonunu gösteren bir enzimdir ve üretimi periodontitiste azalmaktadır. Alveoler kemik yıkımına alenedronatın etkisinin araştırıldığı deneysel bir çalışmada, alendronatın serumdaki BALP düzeyinin düşmesini önlediği belirtilmiştir [25].

1997 yılında, farklı iki araştırma grubu tarafından, kemik yıkımını önleyen ve OPG olarak adlandırılan yeni bir protein türü keşfedilmiştir [26, 27]. OPG'nin bulunmasından sonra bu konu ile ilgili olarak yapılan farklı çalışmalar sonucunda, fizyolojik veya patolojik kemik rezorpsiyonunu yöneten iki farklı protein daha ortaya çıkmıştır. Bunlardan bir tanesi olan nükleer faktör kappa B'nin reseptör aktivatörü (RANK), osteoklastlar üzerinde yer alan ve RANKL ile uyarılarak kemik yıkımına yol açan reseptördür. Diğeri ise RANK ile bağlanan RANKL'dır [28]. Hipokalsemik ve antirezorptif etkili olan OPG, osteoklastların yaptığı kemik yıkımını inhibe eder. OPG ile RANK/RANKL'ın kemik dokusundaki biyolojik etkileri, birbirine zıttır. OPG, RANKL'a bağlanıp tuzak reseptör olarak görev alarak RANKL'ın RANK'a bağlanmasını engeller. Sonuç olarak osteoklast farklılaşması ve aktivasyonu inhibe olur ve kemik rezorpsiyonu oluşmaz [29].

Osteoporoz tedavisinde kullanılan ilaçların çoğu antirezorptif etkili olup, kemik yıkımını baskırlarken, dolaylı olarak kemik yapımını da inhibe etmektedirler. Stronsiyum ranelat (SR) ise kemik yıkımını baskırlarken, kemik yapımının sürekliliğini sağlayan yeni bir preparattır [30, 31].

Daha önce gerçekleştirilen çalışmalarda, postmenopozal osteoporotik kadınlarda SR'nin kemik mineral yoğunluğunu (BMD) arttırarak, vertebral ve non-vertebral fraktür oluşumunu azaltarak etki gösterdiği kanıtlanmıştır [32]. Osteoporotik kadın hastaların serumlarındaki BALP düzeyleri anlamlı olarak yükselmiştir [33]. Ayrıca SR'nin maymunlar üzerinde yapılan bir çalışmada alveoler kemik rezorpsiyonu üzerinde gösterilmiştir [34].

Çalışmamızın amacı, SR'nin anti-rezorptif ve aynı zamanda kemik yapımının sürekliliğini sağlayan özelliklerinden faydalanarak ratlarda oluşturulan ligaturlu deneysel periodontitis modelinde alveoler kemik rezorpsiyonuna etkisinin morfometrik ve histopatolojik açıdan araştırılmasıdır. Bu noktada alveoler kemik kaybının morfometrik olarak belirlenmesi ve immünohistokimyasal olarak RANKL aktivitesi incelenerek sonuçların histopatolojik olarak desteklenmesi hedeflenmektedir. Ayrıca farklı dozlardaki SR uygulamalarının rat serumlarındaki IL-1 β , OPG ve BALP düzeylerine etkisi araştırılacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Periodontal Hastalık

Periodonsiyum, dişeti, alveoler kemik, sement ve periodontal ligamentten oluşan, diş destekleyip çevreleyen yapılar olarak tanımlanmaktadır [35]. Gingivitis ve periodontitis, mikrobiyal dental plağa bağlı olarak görülen, periodonsiyumu etkileyen enflamatuvar hastalıkların iki temel formudur. Mikrobiyal dental plak, gingival dokuların ve periodontal ataşmanın yıkımına neden olan primer etiyolojik faktördür [36]. Gingivitis, ataşman kaybı olmaksızın görülen hiperemi, ödem, sondlamada kanama ile karakterize olan enflamatuvar dişeti hastalığı iken, periodontitis ise ataşman kaybı, periodontal cep oluşumu ve alveoler kemik kaybının görüldüğü enflamatuvar bir dişeti hastalığıdır [37].

Periodontal hastalıklar için bugün geçerli olan sınıflandırma Amerikan Periodontoloji Akademisi'nin düzenlediği "International Workshop for the Classification of Periodontal Diseases"da yapılan sınıflamadır. Burada periodontitis tiplerinin sınıflaması, periodontitisin üç genel klinik formunu tanımlayacak şekilde yapılmıştır. Bunlar: Kronik Periodontitis, Agresif Periodontitis ve Sistemik Hastalıklara Bağlı Periodontitistir [37].

Periodontitisin en sık rastlanan formu kronik periodontitistir [38]. Kronik periodontitis, gingivitisle başlayan ve tedavi edilmediğinde ataşman kaybı ve alveoler kemik yıkımı ile karakterize olan enflamatuvar kronik bir hastalıktır. Kronik periodontitise klinik olarak bakıldığında; dişetinde renk değişikliği, pürüklülüğün kaybolması, keskin olmayan yuvarlak dişeti kenarı ile birlikte spontan veya sondlamayla meydana gelen dişeti kanaması görülür. Farklı derinliklerde periodontal ceplere rastlanabilir ve çoğunlukla horizontal kemik kayıpları görülür. İleri derecede kemik kaybının olduğu vakalarda mobil dişlere de rastlanabilir [37, 39].

Periodontitis ağızın farklı bölgelerinde farklı hızlarda ilerleyebilen, aktif ve pasif dönemlerin görülebildiği bir hastalıktır [40]. Konak savunma mekanizması ile mikroorganizmalar arasındaki denge bozulursa hastalık meydana gelerek kemik yıkımı oluşur ve sonunda dişler kaybedilebilir [37, 39]. Periodontal doku hasarı bakteri ve bakteri ürünleri aracılığı ile veya bakteriyel faktörlere karşı oluşan konak yanıtı ile indirekt olarak gerçekleşir [5]. Periodontal hastalıklardaki doku yıkım

mekanizmalarının oluşumunda enflamatuvar reaksiyonların etkili olduğu bilinmektedir. Periodontal patojenler çeşitli enzim ve toksinler üreterek dokulara zarar verip, enflamatuvar yanıtın başlamasına yol açabilir [41]. Bu süreçte enflamatuvar moleküller olan proteazlar, sitokinler, prostoglandinler ve konak enzimleri üretilir [42, 43]. Proteazlar kollajen yapısını yok ederek lökositlerin bu alanlara toplanıp enflamatuvar sürecin devam etmesine yol açar [44]. Dişeti dokusundaki enflamatuvar yanıt artmaya devam ederek komşu alveoler kemik dokusuna yayılmakta, enflamasyonun alveoler kemiğe yayılması ile periodontitisin iki ana bulgusu olan bağ doku ve alveoler kemik kaybı gerçekleşmektedir [45]. Periodontitiste meydana gelen doku yıkımını endotoksinlerin başlattığı; bu yıkımın bakteriyel flora ve metabolitlere karşı lokal dokulardan ve immün hücrelerden salınan pro-enflamatuvar sitokinler aracılığı ile meydana geldiği düşünülmektedir. Periodontitisin immünopatolojisinde birçok pro-enflamatuvar sitokinin yer almasına rağmen, periodontal doku yıkımına temel olarak TNF- α ve IL-1 β 'nin yol açtığı belirtilmiştir. Bu sitokinler aktif hastalık döneminde ve doku yıkımı sırasında periodontal dokularda artmaktadır [46, 47]. Diğer birçok hastalık gibi periodontal hastalıklarda da patojenik bakterilere karşı oluşan enflamatuvar yanıtta temel hücrelerin polimorfnükleer lökositler (PMNL) olduğu rapor edilmiştir [48].

Subgingival alandaki mikroorganizmaların yıkım oluşturabilmeleri için periodontal dokulara tutunabilmeleri, çoğalmaları, diğer mikroorganizmalarla mücadele edebilmeleri ve kendilerini konak savunma mekanizmalarından korumaları gerekir [8]. Subgingival plak örneği mikroskop altında incelendiğinde plaktaki mikroorganizmalar ve nötrofiller görülebilmektedir. Dişeti oluştuktaki nötrofiller burada yer alan mikroorganizmaları fagositozla yok ederler. Nötrofillerin fagositozla yok ettikleri bakteri miktarı çok fazlaysa bu hücreler ya degranülasyona uğrar ya da patlar. Bunun sonucunda da nötrofillerden ortama toksik enzimler yayılarak doku hasarı meydana gelir. Anlaşılacağı gibi nötrofiller yarar sağlamakla birlikte potansiyel olarak dokuya zarar verebilir. Bu şekilde dokuya verilen zarar miktarı ile periodontal hastalığın ilerleyişi arasında doğru bir orantı vardır [49]. Enflamatuvar yanıtta makrofaj, nötrofil ve lenfositler yer almaktadır. Epitel dokudaki mikroorganizmaları nötrofiller fagositozla yok eder. Epitel dokuyu geçip bağ dokuya ulaşan mikroorganizmalar ise, T lenfositleri, B lenfositleri, nötrofil ve makrofajlar ile mücadele etmek durumundadır Nötrofil ve makrofajlar fagositozu gerçekleştirirken, lenfositler ise mikroorganizmalara karşı verilen immün yanıtta sorumludur. Periodontal doku yıkımında histopatolojik olarak

plazma hücreleri yoğunluğunda artış görülmektedir. Normal koşullarda bir gingivitis lezyonunun periodontitise ilerleyebilmesi için en az 6 aylık bir sürecin gerekli olduğu belirtilmiştir. Periodontal hastalığın oluşması, mikroorganizmalar tarafından başlatılan doku yıkımına karşı verilen konak yanıtı ile yakından ilişkilidir. Doku yıkımı bakteriler tarafından başlatılır, ancak konak yanıtı ile ilerler. Konak yanıtının sonucu olarak üretilen enzimler doku yıkımına neden olur. Bununla birlikte bu süreç, hasar görmemiş dokuları, bakteriler tarafından başlatılan yıkıcı lezyonlardan korumak için gereklidir. Bu süreçteki konak savunmasında bir eksiklik veya bozulma meydana geldiğinde daha şiddetli bir yıkım görülür [8].

Periodontal hastalığın oluşumundan sorumlu mikroorganizmalar büyük ölçüde gram negatif anaerobik basillerden, anaerobik spiroketlerden ve az miktarda anaerobik koklarda oluşur. Derin yıkıcı periodontal lezyonlarda *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ve *Treponema denticola* temel olarak bulunan türlerdir [50]. *Porphyromonas gingivalis* şiddetli kronik periodontitisteki hastalığın yıkıcı formlarında ve aktif lezyonlarda, gingivitise, sağlıklı duruma veya dişsizliğe göre daha sık görülür. İyi tedavi edilmiş bölgelerde sayıları azalır [51, 52]. *Bacteroides forsythus* aktif periodontal lezyonlarda ve yıkıcı periodontal hastalıklarda, sağlıklı duruma veya gingivitise göre daha sık görülür [53, 54]. *Prevotella intermedia* faklı periodontitis formlarında sayıca artmış olarak bulunur [55]. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lokalize agresif periodontitiste baskın tür olarak yer alır [8]. *Treponema denticola* gibi spiroketlerin laboratuvar ortamında kültüre edilmesinin zor olduğu düşünülse de, bu tür anaerobik çubuklar periodontal subgingival mikrofloranın % 30'dan fazlasını oluşturur [8].

2.1.1 Deneysel Periodontitis Modelleri

Periodontal hastalığın seyrini ve tedavi yöntemlerini araştırmak için deneysel hayvan modelleri sıklıkla kullanılmaktadır. Bu nedenle, deney sonuçlarının insanlara uyarlanabilmesi için anatomi ve periodontal hastalık seyri bakımından insana benzeyen hayvanlar çalışmalarda yer almaktadır. Bu amaçla fare, rat, tavşan gibi hayvanlar çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır [56, 57].

Periodontal hastalıkların incelendiği çalışmalarda kemirgenler, özellikle de ratlar ön plana çıkmaktadır. Rat periodontal doku ve hastalıkları insanlardaki ile benzer özellikler taşımakla birlikte farklı yönleri de bulunmaktadır. Ratların epitel, bağ doku, periodonsiyum ve molar diş özellikleri insanlarınki ile oldukça yakındır. Ratlarda her yarım çenede bir keser diş ve 3 molar diş yer almaktadır. Keser dişler köksüz olup sürmeleri ömür boyu devam etmektedir. Molar dişlerin sürmesi ise daha uzun bir süreçte tamamlanmaktadır. Ayrıca insanlarda keratinize olmayan sulkuler epitel ratlarda tam keratinize halde bulunmaktadır [57].

Ratlar periodontal hastalıklara karşı oldukça dirençlidirler; ancak karbonhidrattan zengin diyet, bakteriyel inokülasyon veya diş çevresine ligatür yerleştirilmesi sonucunda periodontal hastalık meydana gelebilmektedir [57].

Ligatürle oluşturulan deneysel periodontitis modelinde ligatürün yol açtığı plak birikimine bağlı olarak oluşan bakteriyel uyarım, rat periodontal dokularında enflamatuvar infiltrasyon, osteoklast oluşum ve aktivitesinde artış, kemik kaybı, ataşman kaybı ve kemik dokusunda fibrotik doku artışına neden olmaktadır [58]. Başlangıç lezyonunda nötrofiller çoğunlukta iken daha sonra mononükleer hücre yoğunluğunda, osteoklast sayısında artış ve sementle alveoler kemikte rezorpsiyon görülmektedir. Bu değişimlerin enflamatuvar mediyatör salınmasındaki artış nedeniyle olduğu düşünülmektedir. Buna ek olarak ratlarda gıda tüketimine bağlı olarak hızlı bir biçimde oklüzal atrizyon görülmektedir. Bu atrizyonla birlikte dişlerde oklüzal, bukkal ve distal yöne doğru migrasyon oluşmaktadır [59]. Bu atrizyona bağlı olarak sürekli bir sement yapımı ve dişlerde sürme durumu vardır. Bu da mine sement sınırı ile alveoler kret tepesi arasındaki mesafede artışa neden olmaktadır. Bu artışın 0,8 mm'ye kadar ulaşabildiği saptanmıştır. Bu durumun da patolojik bir kayıp olmayıp fiyolojik bir durum olduğu belirtilmektedir [57, 60].

2.2 Sitokinler

Farklı hücre tipleri tarafından üretilip salgılanan sitokinler birer polipeptittir. Yapı olarak hormonlara benzemekle birlikte tam bir hormon oldukları söylenemez. Hücre büyümesi, iyileşmesi, enflamasyon ve yaralanmaya karşı oluşan sistemik yanıtı da içeren immün ve enflamatuvar olayları düzenlerler [61]. Farklı görev ve etkilere sahip

olsalar da birtakım ortak özellikleri de vardır [62]. Sitokinler, doğal ve kazanılmış bağışıklığın başladığı fazda üretilirler ve etkileri sistemik veya lokaldir. Bazıları klasik hormon gibi davranırlar ve belirli hücreler tarafından kana veya çeşitli hücresel sıvılara salgılanıp vücudun diğer bölgelerindeki hücresele reseptörlere bağlanırlar. Diğerleri ise daha lokalize etki gösterirler. Bunlar otokrin (bir hücre tarafından salgılanan sitokinin aynı hücre üzerine etkisi) ve parakrin (belirli bir hücre tarafından salgılanan sitokinin yakındaki komşu hücreye etkisi) etkilerdir. İki sitokin birbirlerinin etkisini ortadan kaldıracabilir (antagonizm), arttırabilir (sinerji) veya farklı bir etkiye yol açabilir. Belirli bir biyolojik etkiyi göstermek için gereken sitokin miktarı genellikle çok azdır. Sitokinler genellikle depo edilmezler ve üretimleri yeni genlerin kodlanması ile başlatılır [62].

Hücresele bağışıklıkta etkili olan IL-2, TNF- β ve IFN- α gibi sitokinler yardımcı T-1 hücrelerinden (Th1) salgılanırken, hümorele bağışıklıkta rol oynayan IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 ise yardımcı T-2 hücrelerinden (Th2) üretilir [63]. Endotel hücreleri ve fibroblastlardan köken alan sitokinlerin bir kısmı enflamasyonun ilerlemesine yol açtıkları için pro-enflamatuvar sitokinler, bazıları da enflamasyonu baskılayıcı özellikleri nedeniyle anti-enflamatuvar sitokinler olarak adlandırılır. IL-1 β , IL-6, TNF- α pro-enflamatuvar etki gösterirken, B-lenfositlerin asıl uyarıcıları olan IL-4, IL-10 ve IL-13 gibi sitokinler anti-enflamatuvar özellikleri ile IL-1, TNF ve kemokinler gibi pro-enflamatuvar sitokinleri kodlayan genleri baskılama yeteneğine sahiptirler [22, 64].

Periodontal hastalığın patogeneğinde sitokinlerin rolü geniş çaplı olarak araştırılmıştır. Kemik yıkım belirleyicilerinden biri olarak varsayılan sitokinler, kemik çevresinde bulunur ve osteoklast oluşumu üzerinde etkilidir [65]. Çalışmalar periodontopatojenik bakterilere ve ürünlerine yanıt olarak birçok pro-enflamatuvar sitokinin salgılandığını ortaya koymuştur. Bu sitokinler periodonsiyumda enflamatuvar yanıtı başlatır ve devamını sağlar [19, 66]. Enflamatuvar hastalıklara karşı konak savunmasında etkin olan sitokinler aşırı üretildiklerinde dokularda zararlı etkilere yol açabilirler [22, 64].

2.2.1 İnterlökin-1 β (IL-1 β)

IL-1, enfeksiyon alanına hücrelerin toplanmasını sağlayan pro-enflamatuvar bir sitokindir. Monositler ve fibroblastlardan prostaglandin salınmasını arttırarak kemik yıkımına yol açar. Ayrıca ekstrasellüler matriks proteinlerini yıkan metalloproteinazların salınmasına neden olur [67]. IL-1'in periodontal dokularda bulunan temel formu IL-1 β 'dir. IL-1 β , başlıca monosit ve makrofajlar olmak üzere fibroblast ve kemik dokusu tarafından üretilir. Konak immün yanıtında görev alan IL-1 β anahtar mediyatördür ve enflamatuvar hastalık sonucu oluşan periodontal doku yıkımında etkilidir [22]. IL-1 β kemik rezorpsiyonunu stimüle ederken kemik formasyonunu da inhibe eden bir sitokindir. Prostoglandin sentezi ve proteaz üretimini arttırarak enflamatuvar yanıt oluşumunda rol oynar [68]. Patojenik bakterilerin de neden olduğu pro-enflamatuvar uyarılara yanıt olarak, monosit ve makrofaj hücrelerinin sitoplazmasında IL-1 β prekürsörü olarak indüklenir [69]. Makrofajlardan IL-1 β sekresyonu kaspaz-1 ile ilişkilidir. Bir proteaz türevidir olan kaspaz-1, IL-1 β prekürsörünü olgun ve biyolojik olarak aktif sitokine çevirir [70]. Kaspaz-1 ilk olarak inaktif zimojen olarak üretilir ve daha sonra aktif hale getirilir [71].

IL-1 β 'nin biyolojik fonksiyonları; T lenfositlerinin stimülasyonu ile birlikte lenfokin üretimi, B lenfositlerinin proliferasyonu ile birlikte antikor üretimi, fibroblast proliferasyonu, monosit ve fibroblastlar tarafından üretilen prostoglandin E₂'nin stimülasyonu, nötrofil kemotaksisi, aktivasyonu ve metalloproteinazların salınması şeklinde özetlenebilir [67]. Periodontitis hastalarının enflamasyonlu periodontal dokularında artmış IL-1 düzeyi olduğu belirtilmiştir [72]. IL-1 β kemik rezorpsiyonunu stimüle etmede IL-1 α 'dan 15 kat, TNF- α 'dan 500 kat daha etkilidir [73]. IL-1 β düzeyi, plağa bağlı olarak artmış gingival enflamasyonda [74] ve periodontitiste [75] artmaktadır. Ayrıca periodontal dokulardaki IL-1 β düzeyi, hastalığın şiddetinin klinik ölçümleriyle doğru orantılıdır [76].

2.3 Osteoprotegerin (OPG)

OPG, ilk başta 401 aminoasit olarak üretilen bir polipeptittir. Daha sonra 21 aminoasitlik kısmı ayrılıp 380 aminoasitlik olgun kısmı kalmaktadır. Daha sonra bir glikoprotein olarak hücre dışına salınır. OPG, TNF reseptörleri süper ailesinin bir

üyesidir. Bu ailenin diğer reseptörlerinden farklı olarak transmembran ve sitoplazmik kısımları yoktur. OPG osteoklastogenezisi inhibe edici, hipokalsemik ve antirezorptif özelliğe sahiptir. OPG'nin kemik dokudaki etkileri RANK/RANKL ile ters etki gösterir. OPG, RANKL'a bağlanarak tuzak reseptör gibi görev alır ve RANK'a bağlanmasını önler (Şekil 2.1). Sonuç olarak osteoklast farklılaşması ve aktivasyonu inhibe olur ve RANKL kemik rezorpsiyonu oluşturmaz (Şekil 2.2) [77, 78]. OPG, osteoblastlar dışında kardiyovasküler sistem (kalp, arter ve venler) dahil, böbrek, karaciğer, dalak, beyin, akciğer ve kemik iliği gibi pek çok doku, hematopoetik ve immün hücreler tarafından sentezlenir [78].

Kemik yapım-yıkım dengesinin bozulduğu olgularda OPG/RANK oranında da dengesizlik söz konusudur [78]. Farelerde OPG eksikliğinde kemik hacim ve yoğunluğunda azalma, kırıklarda artış ve osteoporoz görülmüştür [79]. Periodontal hastalıklarda görülen OPG/RANKL oranındaki düşüş, dişeti oluşu sırasında olduğu kadar diğer dokularda da görülmektedir. OPG/RANKL oranı periodontal hastalığa sahip bireylerde sağlıklı bireylere göre genel olarak daha az bulunmuştur [80, 81].

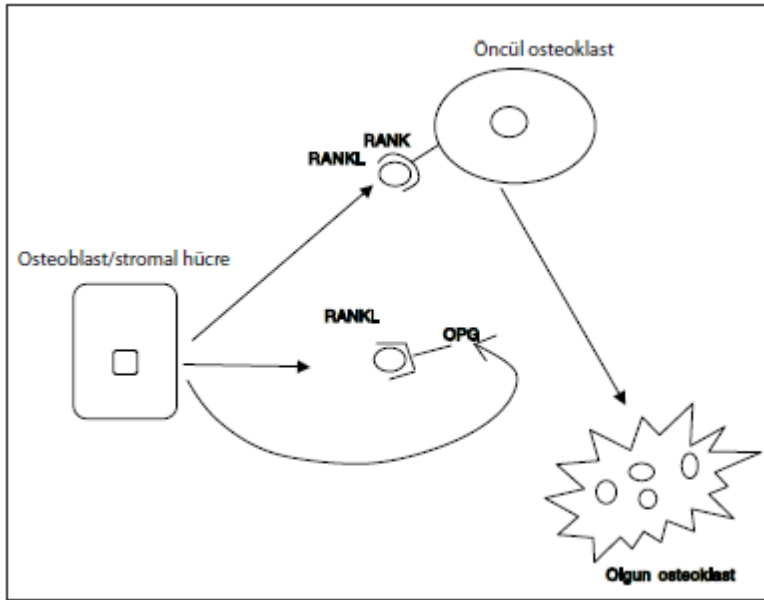
2.4 Nükleer Faktör Kappa B'nin Reseptör Aktivatör Bağlayıcısı (RANKL)

OPG'nin bulunmasından sonra OPG'ye yüksek afinite ile bağlanan, TNF sitokin ailesine bağlı, çözünebilen bir membran protein molekülü olan RANKL tanımlanmıştır [28, 82]. RANKL, normal ve patolojik durumlarda kemik rezorpsiyonunun anahtar aracı maddesi olarak osteoblastik hücreler ve T hücreleri tarafından üretilip osteoklastik hücre farklılaşma ve aktivasyonunu sağlarken osteoklast apoptozisini inhibe eder. RANKL'ın spesifik reseptörü RANK ise osteoklast progenitör hücrelerinden eksprese edilir. RANK'ın RANKL ile bağlanmak için reseptörleri bulunmaktadır. RANK sunan osteoklast ve prekürsörlerinin yüzeyine RANKL'ın bağlanması ile osteoklast farklılaşma ve aktivasyonu gerçekleşir. RANK/RANKL etkileşimi osteoklast aktivasyonu açısından önemlidir. RANKL yokluğunda kemik rezorpsiyonu azalır [28]. RANKL/OPG oranı kemikteki patolojik durumlar açısından önemlidir. RANKL/OPG dengesi osteolitik patolojilerde RANKL lehine bozulmaktadır [83]. Dokulardaki düzeyi yükseldiğinde RANKL, osteoklast öncülerindeki RANK ile bağlanarak osteoklast

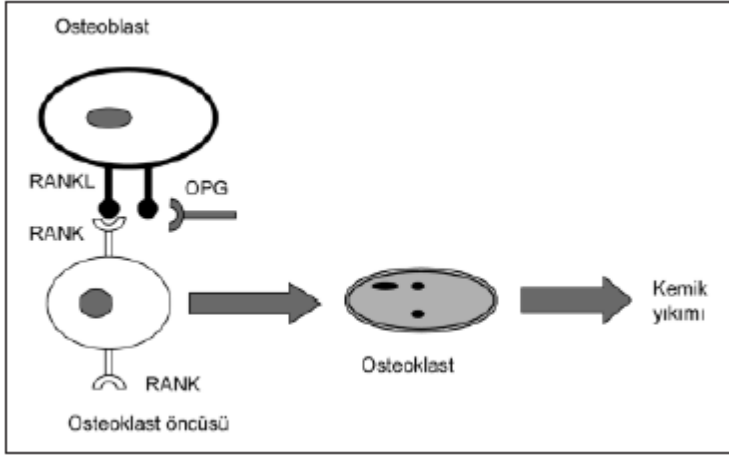
formasyonunda artış ve kemikte rezorpsiyon oluşturmaktadır. Böylelikle RANKL'in osteoklastogenezisteki etkinliği ortaya çıkmaktadır [78].

RANKL osteoblastların dışında T ve B lenfositleri ve fibroblastlar gibi bazı hücre tiplerinde de bulunabilmektedir. RANKL'in fibroblastlardaki ekspresyonu *Actinobacillus actinomycetemcomitans* toksini ile artmakla birlikte normalde düşük düzeydedir [84]. Aktif T ve B lenfositleri, periodontitisli bireylerden izole edilen periodontal dokulardaki en önemli RANKL kaynaklarıdır. T ve B lenfositlerinin periodontitis olgularında periodontal dokulardaki baskın mononükleer hücre tipi olduğu ve sağlıklı dokuya oranla önemli ölçüde daha fazla RANKL eksprese ettiği belirtilmiştir [85].

Dişeti oluğu sıvısındaki RANKL/OPG oranı sağlıklı ve gingivitisli bireylerde, agresif periodontitisli ve immünesupresif tedavi gören veya görmeyen kronik periodontitisli bireylere göre daha düşük bulunmuştur [80]. Periodontal hastalıklarda RANKL/OPG oranının yükselmesiyle birlikte, periodontal hastalık türüne göre bu oranın önemli ölçüde değişmeyeceği öne sürülmüştür [86].



Şekil 2.1 Öncül osteoklast olgun osteoklasta farklılaşmasında OPG, RANK ve RANKL'in rolü [87]



Şekil 2.2 Osteoklast öncü hücreleri RANKL varlığında aktive olmakta ve kemik yıkımında rol almaktadır. OPG varlığında RANKL-RANK bağlantısı engellenmekte ve osteoklast farklılaşması inhibe olmaktadır [88].

2.5 Kemik Spesifik Alkalen Fosfataz (BALP)

Alkalen fosfataz (ALP) özellikle karaciğer, plasenta, kemik ve bağırsağa dağılan ve hücre membranına tutunarak görev alan bir metalloenzimdir. BALP ise, ALP'nin bir izoenzimi olup kemik yapımında rol alır. Ayrıca kemik mineralizasyonunun inhibitörü olan inorganik pirofosfatın ortadan kaldırılmasında görev alan temel enzimdir. Bu şekilde BALP kemik mineralizasyonuna katkı sağlarken, kemik yapımının da spesifik bir belirleyicisidir [89]. Osteoblastik aktiviteyi gösteren BALP, kemik yapım metabolizmasının saptanmasında kullanılan en önemli belirteçlerden bir tanesidir. Osteoblastlar tarafından üretilir ve osteogenezisin erken evreleri ile ilişkilendirilmektedir [90].

BALP düzeyi ile implant osseointegrasyon derecesi arasındaki ilişkinin incelendiği bir çalışmada, osteoporotik ratların tibialarına titanyum implantlar yerleştirilmiştir ve osseointegrasyon miktarı ile serum BALP düzeyi arasında bir korelasyon olabileceği belirtilmiştir [91].

2.6 Bifosfonatların Periodontolojide Kullanımı

Bifosfonatlar pirofosfatın kimyasal analoglarıdır ve temel olarak osteoklastları inhibe ederek kemik rezorpsiyonunu azaltan ilaçlardır [92]. Menopoz sonrası bayanlarda

kemik mineral yoğunluğunu arttırarak osteoporozla bağlı kemik kırıklarının azaltmada, osteoporoz tedavisinde, Paget hastalığında, meme ve prostat kanserlerinde kemik metastazını ve multipl myeloma'da kemik lezyonlarını önlemek amacıyla sıklıkla kullanılmaktadırlar. Osteoklastik aktiviteyi inhibe etmelerinden dolayı osteoblast-osteoklast dengesini, yani kemik turnoverını bozarlar. Bu nedenle kemik iyileşmesi üzerine olumsuz etki gösterdikleri rapor edilmiştir [93].

Bifosfonatlar nitrojen içeriklerine göre nitrojen içermeyen (alkalibifosfonatlar) ve nitrojen içeren (aminobifosfonatlar) olarak iki gruptan oluşmaktadır. Nitrojen içermeyenler birinci kuşak olarak adlandırılan eski bifosfonatlar olup isimleri şu şekildedir [94]:

- Etidronat
- Tiludronat
- Klodronat

Nitrojen içeren bifosfonatlar ise ikinci ve üçüncü kuşak bifosfonatları kapsamaktadır. Etkileri birinci kuşak bifosfonatlara göre daha fazladır. İkinci kuşak bifosfonatların isimleri şu şekildedir [95]:

- Alendronat
- Pamidronat

Son olarak üçüncü kuşak bifosfonatlar, etkisi en fazla olan bifosfonatlardır. İsimleri şöyledir:

- Risedronat
- İbandronat
- Zoledronat

Bifosfonatların osteoklastik aktiviteyi inhibe etme mekanizmasının tam olarak açıklanamamış olmasının yanı sıra, farklı nesildeki ilaçların mekanizmalarının da değişkenlik gösterdiği bilinmektedir. İlk kuşak bifosfonatlar oral yolla kullanılan ilaçlardır ve apoptozisi indükleyip osteoklastların ölümüne yol açarak etki gösterirler [96]. Nitrojen içeren yeni nesil bifosfonatlar ise kemik iliği hücrelerinin osteoklastlara

dönüşmesini engellemektedir. Bu şekilde rezorptif aktivite ve turnover hızında azalma görülmektedir [97, 98].

Bifosfonatların matriks formasyonunu arttırarak osteostimülatif etki gösterdiği in-vivo ve in-vitro olarak gösterilmiştir [99, 100]. Bifosfonatların osteoblastları uyarak OPG üretimini arttırdığı ve bu yolla osteoklast aracılı kemik rezorpsiyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Aynı zamanda bifosfonatların, erken osteoblastogenezisi destekleyerek osteoblast prekürsörlerinin ve mineralize nodüllerin formasyonunu stimüle ettiği saptanmıştır [101, 102].

Alendronat ile ilgili daha önce yapılan insan ve hayvan çalışmalarında sistemik alendronat kullanımının kemik rezorpsiyonunu azaltıp alveoler kemik yoğunluğunu arttırdığı gösterilmiştir [103, 104]. Periodontal cerrahi prosedürlerin, osteoklastik aktivite artışıyla birlikte farklı miktarlarda alveoler kemik rezorpsiyonuna yol açtığı öne sürülmüştür [105]. Sistemik veya topikal alendronat kullanımının mukoperiostal flep cerrahisinden sonra alveoler kemik rezorpsiyonunu etkin bir biçimde azalttığı belirtilmiştir [106, 107]. Bununla birlikte sistemik alendronat kullanımı ile çenelerdeki avasküler osteonekroz oluşumu arasında ilişki olabileceği öne sürülmüştür. Bu nedenle şiddetli periodontal hastalık, periradiküler lezyon ve immünesupresif tedavi durumlarında periodontal tedaviye ek olarak sistemik alendronat kullanımı sınırlandırılmalıdır [108, 109]. Alendronat gibi nitrojen içeren bifosfonatların periodontal patojen bakterilerle indüklenmiş IL-1 β salınmasını, kaspaz-1'i aktive ederek arttırdığı bildirilmiştir. Bu durumun da nitrojen içeren bifosfonatların enflamatuvar bir yan etki olarak, çenelerde oluşabilecek osteomyelit olguları için zemin hazırlayabileceği rapor edilmiştir [110].

Ratlarda oluşturulan deneysel periodontitis modelinde sistemik olarak uygulanan alendronatın, serum BALP miktarında azalmaya neden olduğu ve alveoler kemik kaybını engellediği saptanmıştır [25]. Ovariectomize ratlarda östrojen eksikliğine ve deneysel periodontitis oluşturulmasına bağlı alveoler kemik kaybı, sistemik olarak uygulanan alendronatla önemli ölçüde önlenmiştir [111]. Alendronatın gingival dokulardaki prostoglandin E₂ ve lökotrien B₄ düzeylerini düşürdüğü, alveoler kemik yıkımını önlediği deneysel olarak gösterilmiştir [112]. Simvastatin-alendronat- β -siklodekstrin karışımının lokal olarak kullanıldığı deneysel bir çalışmada periodontitis oluşumunun kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı görülmüştür [113]. Lokal

olarak cep içine uygulanan alendronat jelin kemik içi defektlerin dolumuna, sondlama derinliğine ve ataşman düzeyine olumlu etkisi saptanmıştır [114].

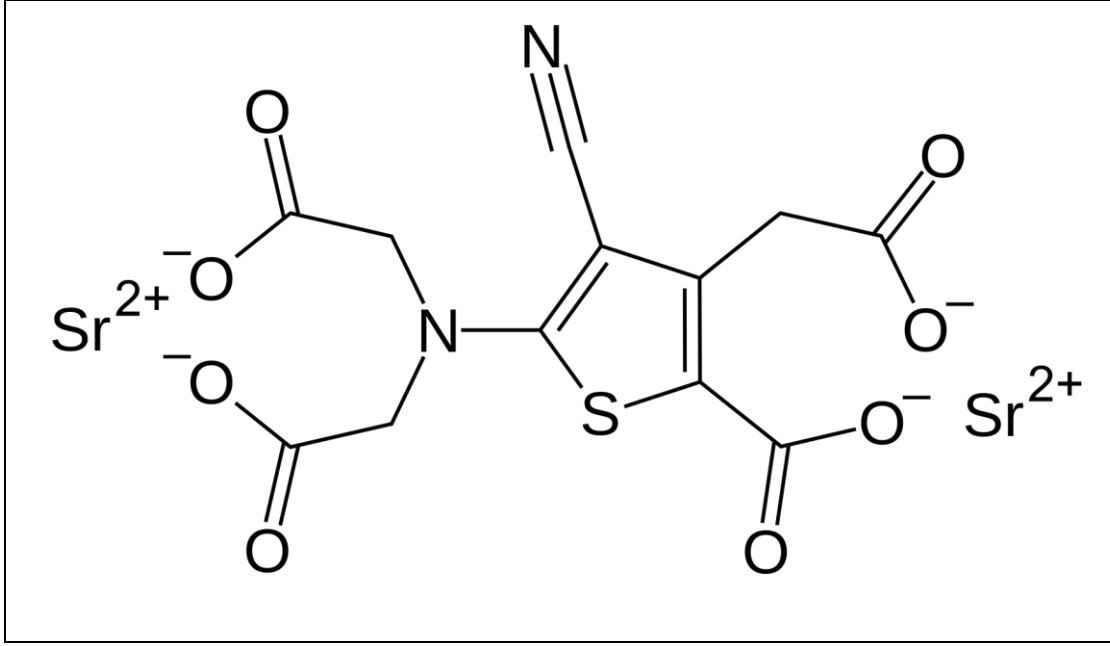
Bifosfonatlardan farklı olarak SR ise sahip olduğu ikili etki sayesinde kemik yıkımını baskımlarken kemik yapımının da sürekliliğini sağlamaktadır. Bifosfonatlar ise osteoblastik aktiviteyi olumsuz etkileyerek kemik yapımını % 50'ye kadar azaltabilmektedir. Bu biçimde SR'nin bifosfonatlara göre bir üstünlüğü ortaya çıkmaktadır [115].

2.7 Stronsiyum Ranelat (SR)

SR oral olarak kullanılan, osteoblast aracılı kemik formasyonunu arttıran ve osteoklastik rezorpsiyonu azaltan, anti-osteoporotik bir ajandır [115].

2.7.1 SR'nin Kimyasal Yapısı ve Biyolojik Etkileri

SR, ranelik asit ve iki adet stabil stronsiyum atomundan oluşmaktadır. İçeriğindeki stronsiyum, 1770'li yıllarda İskoçya yakınlarında bir kurşun madeninde bulunmuştur ve besinlerde, suda ve eser miktarda da kemik dokusunda bulunmaktadır [116]. SR, 20 farklı tuz arasından stronsiyumun biyoyararlanımının, gastrik toleransının iyi olması nedeniyle ve stronsiyum ile organik bileşen arasındaki yüksek orandan dolayı tercih edilmiştir [30]. Stronsiyum, divalent bir katyon olup atomik ve iyonik özellikleri ile kalsiyuma benzemektedir ve kemik mineralizasyonuna katılmaktadır [30, 117]. Özellikle kalsiyum gibi hidroksiapatit kristallerinin yüzeyine bağlanarak kemikte tutulan, kemik koruyucu bir elementtir. Hidroksiapatitteki kalsiyum ile stronsiyumun değişimi sınırlıdır. Kemik tutulumu, kemik matriksinin kristal yüzeylerinde düşük oranda iyonik geçiş nedeni ile olur [117].



Şekil 2.3 SR'nin kimyasal yapısı

Günümüzde SR'nin ikili etkisiyle ilgili olarak iki görüş öne sürülmüştür:

- 1- Kalsiyum duyarlı reseptörü (CaSR) veya başka bir katyon duyarlı reseptörü aktive ederek etki göstermektedir [118].
- 2- OPG ekspresyonunu arttırarak ve osteoblastların RANKL ekspresyonunu azaltarak etki göstermektedir [119].

SR'nin, iyonik ve atomik özelliklerinin kalsiyuma benzemesinden dolayı CaSR'nin agonisti olarak varsayılabileceği belirtilmiştir. İnsandaki hipo veya hiperkalsemik bozuklukların da yine CaSR geninin kodlama bölümündeki mutasyonlarla ilgili olduğu bilinmektedir. SR, osteoklast farklılaşma ve aktivitesini azaltıp, preosteoblastların hücrel proliferasyonunu uyarır. Bunun sonucunda da matriks depozisyonu ve kemik formasyonu gelişmektedir. Ayrıca CaSR, osteoblastik gelişimin proliferasyon fazından preosteoblastik faza, en son da olgun kemik oluşumuna kadar olan tüm evrelerinde eksprese edilmektedir [120]. SR aynı zamanda trabeküler ve kortikal kemiğin mikromimari yapısında düzelme, kortikal kemik kütle, alan ve kalınlığında artış, fizyolojik mineralizasyonda iyileşme gibi biyomekanik etkilere yol açmaktadır [121].

2.7.2 SR'nin Kemik Dokusuna Etkileri

SR'nin daha önce OPG maddesindeki mRNA (mesajcı ribonükleik asit) miktarındaki artışı indüklediği, insan osteoblastlarındaki RANKL mRNA'sında ise azalmaya yol açtığı gösterilmiştir [122]. Düşük dozlarda SR'nin OPG ekspresyon ve üretimini arttırarak, osteoblastların RANKL ekspresyonunu azalttığı in vitro olarak gösterilmiştir [119, 122].

Kemik kaybının önlenmesindeki etkinliğin saptanması için SR, öncelikle osteopenik hayvanlar üzerinde denenmiştir. Postmenopozal bayanlardaki kemik rezorpsiyonunun kemik formasyonundan daha fazla olduğunu, trabeküler kemik üzerinde gösterebilmek için deneysel ovariektomi modeli kullanılmıştır. Farklı dozlardaki SR'nin dişî ratlara koruyucu olarak ve tedavi amaçlı verilmesinin trabeküler kemik kaybını inhibe ettiği, parsiyel olarak kemik kütlesini arttırdığı saptanmıştır [123]. Biyokimyasal ve histomorfometrik analizler ile SR'nin, kemik rezorpsiyonunu azalttığı, kemik formasyonunu ise yüksek düzeyde devam ettirdiği belirtilmiştir. SR'nin olumlu etkileri hem trabeküler hem de kortikal kemikte gözlenmiştir [123, 124].

Choudhary ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada SR'nin osteoblastlar üzerine etkisinde, prostaglandinlerin rolü incelenmiştir. Kemik iliğindeki osteoblastik prekürsörler veya sıçan kafatasından elde edilen primer osteoblastlar 7-14 gün kültür edilmiştir. Sonrasında çeşitli zamanlarda SR uygulanmış ve SR'nin primer osteoblast proliferasyonunu, primer osteoblast ve osteoblastik prekürsör ALP aktivitesini arttırdığı gözlenmiştir [125]. Bu noktada kemik formasyonu ve osteoid mineralizasyonu süreçlerinde yer alan BALP'nin anahtar rol oynadığı bilinmektedir. SR'nin hedef hücresi olduğu öne sürülen osteoblastlar yüksek düzeyde BALP üretmektedir. Magnezyum iyonu ile birlikte uygulanan SR'nin BALP aktivitesinde artış sağladığı bildirilmiştir. Kofaktör olarak uygulanan çinkonun da BALP aktivitesini arttırdığı belirtilmiştir [126].

Ratlara SR'nin günlük 900 mg/kg oral olarak verildiği bir çalışmada 4 hafta sonra SR uygulanan grupta % 40 daha az diş hareketi gözlenmiş, diş çevresindeki osteoklastik aktivite ve kök rezorpsiyonun da azaldığı tespit edilmiştir. Bulgulara göre SR'nin ortodontide ankraji arttırmak için kullanılabileceği belirtilmiştir [127]. Bunun yanı sıra başka bir çalışmada ratlarda deneysel olarak oluşturulan 10 günlük süreçteki

rapid maksiller ekspansiyona günlük 600 mg/kg dozdaki SR'nin ek bir yararı olmadığı rapor edilmiştir [128].

2.7.3 SR'nin Anti-enflamatuvar Etkileri

İnsan periodontal ligament hücreleri üzerindeki SR uygulanması IL-6 üretimini baskılayarak enflamasyon oluşumunu azaltmıştır [129]. Etki mekanizması, gerekli doz ve kullanım süresi tam olarak açıklanamamakla birlikte SR kullanımının osteoartritte meydana gelen enflamasyon oluşumunu azalttığı öne sürülmüştür [130]. SR'nin IL-1 β üretimini deneysel olarak azalttığı belirtilmiş olsa da [131, 132], önemli bir fark yaratmadığı in vitro olarak gösterilmiştir [133].

2.7.4 SR'nin Farmakokinetik Özellikleri

Etkinlik ve güvenilirlik açısından günlük önerilen 2 gr dozda SR'nin biyoyararlanımı oral yolla alımından sonra % 27 olarak ölçülmüştür. SR'nin kalsiyuma benzer bir biçimde gastrointestinal yoldan 2 yolla emiliminin gerçekleştiği düşünülmektedir. Bunlar; düşük bir dozda olan aktif emilim ve doygunluğa ulaşmayan daha yüksek dozda olan pasif emilim olarak belirtilmiştir. SR'nin 2 gr'lık tek doz olarak oral yoldan alımından sonra ranelik asidin mutlak biyoyararlanımı % 2,5'tir. Ranelik asidin lipofilik özelliğinin düşük olması ve SR'nin çözünürlüğünün de az olmasının SR'nin emilimini azaltabileceği öne sürülmüştür. 25 günlük kullanımda (günlük doz 0,5-4 gr) plazma konsantrasyonları bakımından stronsiyum ve ranelik asit için kararlı duruma 15 gün sonra ulaşılmıştır. Her iki maddenin vücuttan atılımı özellikle böbrekler yoluyla olmaktadır [30].

Postmenopozal kadınlarda stronsiyumun yarılanma ömrü $6,3 \pm 2,7$ gün, ranelik asidin yarılanma ömrü ise $3,3 \pm 2,3$ gün olarak belirtilmiştir. SR'nin postmenopozal kadınlar tarafından sürekli kullanımı sonucunda stronsiyum kemiklerin yapısına dahil olmakta ve 3-24 ay arası bir süreçte plazma konsantrasyonunda stabil kalmaktadır. Tedavi sona erdikten sonra kemiklerden hızla elimine edilen SR gastrointestinal sistem ve böbrekler yoluyla vücuttan atılır. Kemikteki stronsiyum içeriği tedavi sona erdikten sonraki 6 haftada % 50 azalır. Tam olarak ise 3 yılda elimine olmaktadır [30].

2.7.5 SR'nin Yan Etkileri

SR ile yapılan klinik çalışmalarda en sık görülen yan etkiler diyare, bulantı, baş ağrısı ve cilt irritasyonudur. Nadir olarak baygınlık, hafıza sorunları ve çok ender olarak nöbetler görülür. Plasebo kontrollü çalışmalarda venöz tromboemboli görülme sıklığında artış görülmüş, ancak bunun nedeni tam olarak açıklanamamıştır [134, 135]. Bu nedenle venöz tromboemboli SR kullanımını için bir kontrendikasyon olarak kabul edilmese de, bu hastalığı geçirmiş veya risk taşıyan bireylerde SR dikkatli kullanılmalıdır. SR erken dönem postmenopozal kadınlarda omurga ve femur BMD değerini önemli derecede arttırmıştır. 24 aylık süreçte, günlük 1 gr SR kullanımında plasebo grubuna göre hiçbir önemli yan etkinin görülmediği belirtilmiştir [30].

SR kullanımına ilişkin DRESS (drug rash with eosinophilia and systemic symptoms) (eozinofili ve sistemik semptomlarla birlikte görülen ilaç yan etkisi) olarak adlandırılan ciddi alerjik reaksiyon olguları gözlenmiştir. DRESS ateş, lenfadenopati, ellerde şişlik, eozinofili ve deride döküntüler ile başlar, karaciğer, böbrek ve akciğerleri etkiler. 3 yıllık kullanımda 57000 hastanın 2'sinde ölümcül olmak üzere toplamda 16 hastada bu semptomlar görülmüştür (European Medicines Agency tarafından Avrupa'da 2004 yılında kullanılmaya başlanmasından sonra 16 Kasım 2007'ye kadar olan süreçte). Rapor edilen ciddi reaksiyonlar tedavi başlangıcından sonraki 3-6 haftalık süreçte ortaya çıkmıştır. Daha sonra 2009 yılında Avrupa'da SR kullanımına ilişkin üç olgu daha bildirilmiştir [30, 136]. 2014'te Tayvan'da bir olgu daha bildirilmiştir [137]. Kortikosteroid tedavisi ile birlikte ilacın kesilmesi sonucu genelde iyileşme sağlanır. Bununla birlikte iyileşme hızı değişebilir ve semptomlar geri dönebilir. SR kullanımını takiben haftalar içinde oluşan döküntü, sistemik semptomlar ve anlamlı eozinofili üçlemesi görülen hastalarda DRESS düşünülmelidir. Bu hastalarda SR kullanımı sonlandırılmalıdır [138].

SR'nin kardiyovasküler kalp hastalıkları riskini arttırabileceği belirtilmiş olsa da [139], böyle bir ilişkinin olmadığını belirten çalışmalar da literatürde yer almaktadır [140, 141]. Bunun dışında iskemik kalp hastalığı, periferik vasküler hastalık, serebrovasküler hastalık, kontrolsüz hipertansiyon durumlarında ve akut miyokard infarktüs riski taşıyan hastalarda SR kullanılmaması gerektiği belirtilmiştir [139, 142]. 2015'te yapılan klinik bir çalışmada postmenopozal kadınlar 2 gruba ayrılıp deney grubuna 1 yıl süreyle günlük olarak 2 gr SR oral yolla kullanılmıştır. Çalışmanın

başlangıcında 3., 6. ve 12. ayında 2 grup arasında kardiyovasküler risk faktörleri açısından herhangi bir fark görülmediği rapor edilmiştir. Daha önce SR kullanımı ile arttığı belirtilen venöz tromboemboli ve miyokard infarktüs riskinin ise diğer faktörlerle ilişkili olabileceği belirtilmiştir [143].

Literatürde SR'nin kemik dokusu ve periodontal dokular üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmalar incelenmiştir. Bizim çalışmamız ise SR'nin deneysel periodontitis modelindeki etkilerinin araştırıldığı ilk çalışma olma niteliğindedir. Çalışmamızda SR'nin kemik dokusu üzerindeki etki mekanizmaları göz önüne alınarak, RANKL miktarını düşürerek alveoler kemik yıkımını azaltabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte elde edilecek verilerin histopatolojik olarak ve ayrıca serum IL-1 β , OPG ve BALP düzeyleri ile desteklenmesi hedeflenmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırma için Cumhuriyet Üniversitesi Hayvan Deneyleti Etik Kurulu tarafından 10.04.2014 tarih ve 146 sıra numarası ile onay alındı. Denek olarak 12 haftalık, ortalama ağırlıkları 280-300 gr olan Wistar cinsi 40 adet erkek rat kullanıldı. Deney hayvanlarının seçiminde genel sağlık durumlarının iyi olması ve önceden üzerinde herhangi bir çalışma yapılmamış olması gibi şartlara özen gösterildi. Her bir gruptaki ratlar ayrı kafeslerde aynı şartlarda beslendi. Tüm ratlar 12 saat gece/gündüz, 21±1°C sıcaklık ve %40-60 nem oranı gözetilerek standart diyet ve su ile beslendiler. Ratlar çalışma öncesi yeni yaşam koşullarına hazırlanması için 10 gün metal kafeslerde tutuldu. Çalışmamızın deney aşamaları Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

3.1 Çalışma Grupları

Ratlarda deneysel işlemler için sağ mandibular birinci molar dişler seçildi. Denekler rastgele olarak 5 gruba ayrıldı.

1. grup: Kontrol grubu. (n=8)

2. grup: Ligatürlü deneysel periodontitis grubu. (Ligatür grubu, n=8)

3. grup: Ligatürlü deneysel periodontitis + 11 gün boyunca günlük sistemik olarak uygulanan 300 mg/kg SR grubu. (SR300, n=8)

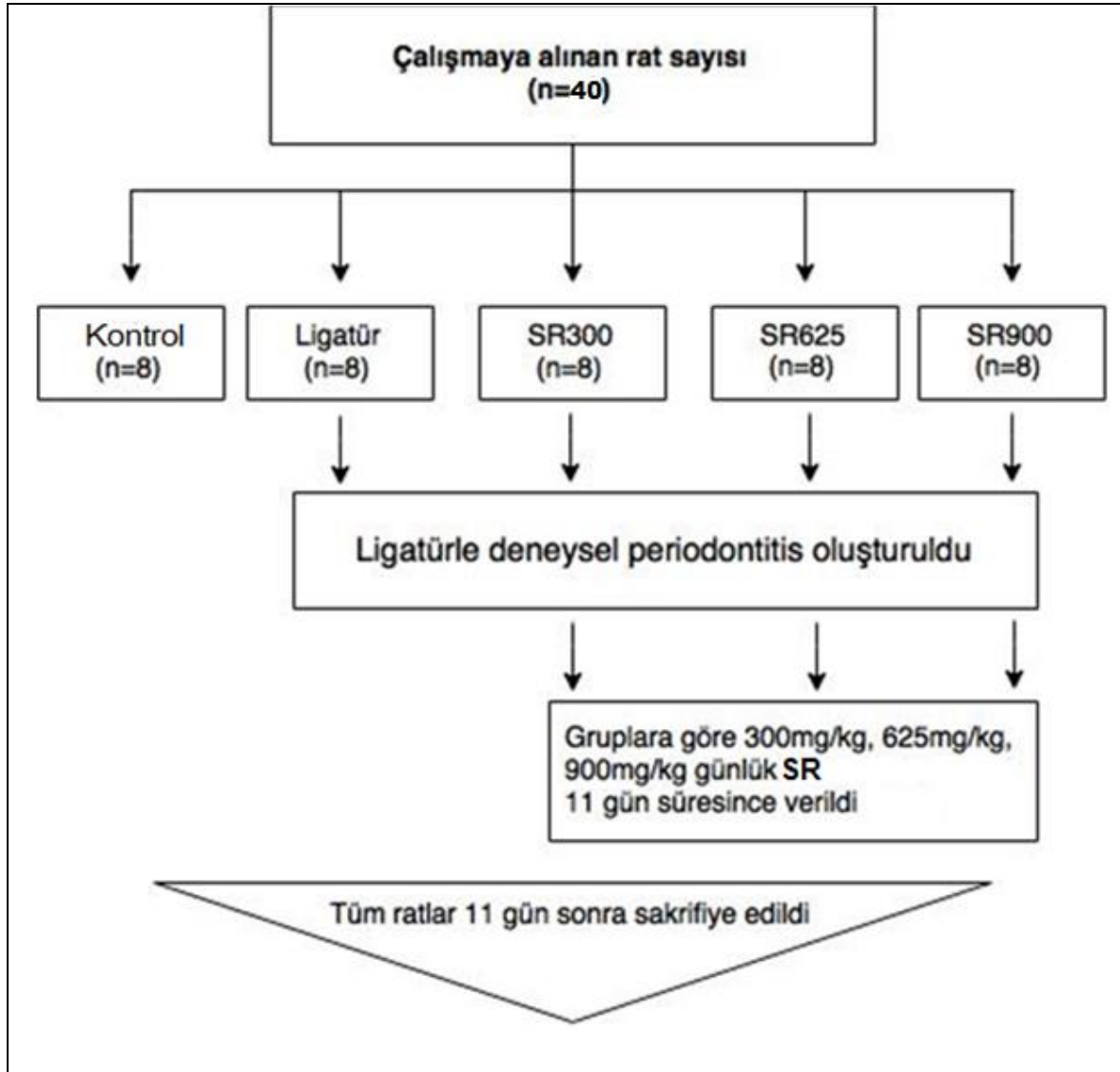
4. grup: Ligatürlü deneysel periodontitis + 11 gün boyunca günlük sistemik olarak uygulanan 625 mg/kg SR grubu. (SR625, n=8)

5. grup: Ligatürlü deneysel periodontitis + 11 gün boyunca günlük sistemik olarak uygulanan 900 mg/kg SR grubu. (SR900, n=8)

3.2 Çalışma Prosedürü

3.2.1 Deneysel Periodontitis Oluşturulması

Rompun (Bayer, İstanbul, Türkiye) 5 mg/kg s.c. veya i.m. ve Ketalar (Pfizer, New York, ABD) 30 mg/kg i.m. kullanılarak denekler anestezi altına alındı. Tüm ratların sağ mandibuler birinci molar dişlerine steril 4/0 ipek ligatür (Doğsan İlaç Sanayi, İstanbul, Türkiye) subgingival olarak yerleştirilerek bu bölgede plak retansiyonu sağlamak koşuluyla deneysel periodontitis oluşturuldu. Süturlar 11 gün boyunca günlük kontrol edildi.



Şekil 3.1 Çalışma dizaynı şeması

3.2.2 SR Uygulaması

Ratların ağırlıkları göz önünde tutularak her bir gruptaki tüm ratlar için uygun SR konsantrasyonu hazırlandı. Günlük olarak distile su içinde çözünerek hazırlanan SR, tüm ratlara uygun konsantrasyonda sistemik olarak gastrik gavaj yoluyla günlük 1'er cc olarak verildi.

3.2.3 Sakrifikasyon

Çalışmanın 12. gününde anestezi altında tüm ratlar sakrifiye edildi. Kardiyak ponksiyon ile 4 cc kan alınarak jelli tüplere (Vacutest, Kima, İtalya) konuldu. Daha sonra 200 mg/kg i.p. pentotal sodyum (Ekipental, Tümekip İlaç San, İstanbul, Türkiye) enjeksiyonu ile sakrifiye edilen ratların mandibulaları çıkarıldı. Çıkarılan mandibulalar %10'luk formaldehit solüsyonunda fikse edildi.

3.2.4 Ratlardan Serum Elde Edilmesi

Ratlardan kardiyak ponksiyon ile alınan 4 cc'lik kan örneği Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda 10 dakika (3000 devir/dakika) santrifüj edildi (Nüve NF-1000 R İstanbul-Türkiye). Örnekler serum ve plazma olarak ayrıldıktan sonra serum kısmı eppendorf tüplere alındı ve enzim bağlı immünosorbent analizi (ELİZA) ile değerlendirileceği güne kadar -80⁰C'de saklandı.

3.2.5 Morfometrik Değerlendirme

Histopatolojik işlemlerden önce mandibulalar metilen mavisine batırılarak stereomikroskop (Stemi DV4, Carl Zeiss, Almanya) altında 16x büyütmede mikroskoba uyumlu bir fotoğraf makinesi (Canon EOS 1000, Tokyo, Japonya) ile görüntüler alınıp bilgisayara aktarıldı. Bu fotoğraflar üzerinden bir görüntü analiz programı (Clemex Vision Lite, Quebec, Kanada) ile morfometrik ölçümler yapıldı. Alveoler kemik kaybı her bir dişin altı farklı bölgesinden mine-sement sınırı ile alveoler kret tepesi arasındaki mesafe ölçülerek belirlendi. Her bir dişin ortalaması hesaplanarak o diş için alveoler kemik kaybı miktarı µm cinsinden kaydedildi.

3.2.6 Histopatolojik İşlemler

Deneysel araştırmanın histopatolojik değerlendirmesi Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Histopatolojik analizler için mandibulalar % 10'luk formaldehit solüsyonunda 24 saat süresince tespit edildi. Örnekler % 3'lük nitrik asitte dekalsifiye edildikten sonra parafine gömülecek çalışma bölgeleri bistüri aracılığıyla dikkatli bir biçimde çıkarıldı. Distile su ile yıkanan örnekler derecesi giderek artan alkol serileri ile dehidratasyonu takiben, ksilen ile şeffaflaştırma işlemi uygulanarak parafine gömüldü. Bloklardan alınan 5 µm kalınlıktaki seri kesitler histopatolojik değerlendirme için 1 gece 60°C etüvde bekletilerek ksilende deparafinize edildikten sonra rehidratasyon işlemi uygulanarak Hematoksilen-Eozin ile boyandı. Boyama işleminden sonra kesitler ışık mikroskobu (Nikon Eclipse 80i, Nikon, Tokyo, Japonya) altında x40, x100, x200 ve x400 büyütmelemlerde değerlendirildi. Kesitlerde periodontal dokularda enflamatuvar hücre infiltrasyonu, alveol kemik ile interdental septumdaki osteoklast ve osteoblast sayıları incelendi. Enflamatuvar hücre infiltratı semi-kantitatif bir değerlendirme [144] ile gözle görülebilir infiltrat yokluğu (0), hafif derecede enflamatuvar hücre varlığı (1), orta derecede enflamatuvar hücre varlığı (2) ve şiddetli derecede enflamatuvar hücre varlığı (3) olarak skorlandı. Osteoklastlar ve osteoblastlar morfolojileri dikkate alınarak sayıldı.

RANKL immünohistokimyasal boyama:

Parafine alınmış dokulardan 3 µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler tam otomatik slayt hazırlama sistemi cihazında (Ventana Benchmark XT, Roche, Almanya) 32 dakika süresince antikor (anti-RANKL antikor, Novus Biological, NB100-80849) ile inkübe edildi. Yaklaşık 4 saat cihazda bekleyen slaytlar işlem sonrası çeşme suyunda yıkandı. % 80, % 90, % 100 alkol serisinden geçirilerek etüvde 65°C'de 1.5 saat kurutuldu. Son olarak ksilen ile şeffaflandırılarak entellan yardımıyla üzerileri kapatıldı ve ışık mikroskobu kullanılarak analiz edildi. Mandibuler birinci molar dişi çevreleyen kemikte RANKL pozitif olan bölgeler saptandı ve bu bölgelerin yüzdesi toplam alana göre hesaplandı. RANKL pozitif hücrelerin yüzdesi % 0 ile % 5 arasında ise skor 0, % 5 ile % 25 arasında ise skor 1, % 25 ile % 50 arasında ise skor 2, % 50 ile % 75 arasında ise skor 3, % 75'ten fazla ise skor 4 olarak değerlendirildi [145].

3.2.7 IL-1 β ELISA Kitinin Hazırlanması

Rat IL-1 β ELISA kiti (eBioscience Platinum, Viyana, Avusturya) kullanıldı.

Standart Kontrolleri

Yıkama Solüsyonu

50 ml yıkama solüsyonu + 1000 ml distile su hazırlandı.

Assay Buffer

5 ml deney tamponu + 100 ml distile su hazırlandı.

Biotin Konjugat

12 strip için; 60 μ l Biotin Konjugat + 5.94 ml deney tamponu hazırlandı.

Streptavidin-HRP

12 strip için; 60 μ l Streptavidin-HRP + 11.94 ml deney tamponu hazırlandı.

Rat IL-1 β Standart

Şişe üzerinde yazan miktar kadar distile su ile sulandırıldı. 10-30 dakika homojen şekilde karışması için beklenildi ve karıştırıldı. (4000 pg/ml)

Deney Prosedürü

1. Mikro plak kuyucukları iki defa yıkandı.
2. Standartlardan kuyucuklara 100 μ l aktarıldı.
3. Blank kuyucuğuna 100 μ l örnek dilüent eklendi.

4. Örnek kuyucuklarına 50 µl örnek dilüent eklendi.
5. Örneklerden 50 µl aktarıldı.
6. Hazırlanan Biotin Konjugattan 50 µl aktarıldı.
7. Üzeri kapatılıp 2 saat oda ısısında inkübe edildi.
8. Sonra üç defa yıkandı.
9. 100 µl sulandırılan Streptavidin-HRP eklenerek üzeri kapatıldı.
10. Oda ısısında 1 saat inkübe edildi.
11. Üç defa yıkandı.
12. 100 µl TMB Substrat Solüsyonu eklendi.
13. 10 dakika oda ısısında inkübe edildi.
14. 100 µl stop solüsyonu eklendi.
15. 450 nm dalga boyunda okundu.
16. Standartlara göre grafik çizildi.
17. Örnekler bu grafiğe göre değerlendirildi.
18. Çıkan sonuçlar iki ile çarpıldı.

3.2.8 OPG ELISA Kitinin Hazırlanması

Rat OPG ELISA kiti (SunRed Biological Technology, Şangay, Çin) kullanıldı.

Standart Kontrolleri

120 µl'lik standartlara 120 µl standart dilüent eklenerek karışım elde edildi.

Deney Prosedürü

1. Standart kuyucuğuna 50 µl standart ve 50 µl Streptavidin-HRP eklendi.
2. Blank kuyucuğuna yalnızca Kromojen A ve B konuldu.
3. İncelenecek örneklerden 40 µl kuyucuklara konulup üzerine OPG antikoruna eklendi.
4. Örneklerin üzeri kapatılıp 60 dakika 37⁰C'de inkübasyon sağlandı.

5. Yıkama solüsyonu 30 defa sulandırıldı. Kuyucuklar 1 dakika arayla 5 defa distile su ile yıkandı.
6. Tüm kuyucuklara Kromojen A ve B'den 50 µl konuldu.
7. Karanlık ortamda 37⁰C'de 10 dakika inkübasyon sağlandı.
8. 50 µl stop solüsyonu eklendi.
9. 450 nm dalga boyunda okunup sonuçlar değerlendirildi.

3.2.9 BALP ELISA Kitinin Hazırlanması

Rat BALP ELISA kiti (SunRed Biological Technology, Şangay, Çin) kullanıldı.

Standart Kontrolleri

120 µl'lik standartlara 120 µl standart dilüent eklenerek karışım elde edildi.

Deney Prosedürü

1. Standart kuyucuklarına 50 µl standart konuldu. 50 µl Streptavidin-HRP eklendi.
2. Blank kuyucuğuna yalnızca Kromojen A ve B konuldu. Daha sonra stop solüsyonu eklendi.
3. İncelenecek örneklerden 40 µl kuyucukların her birine dağıtıldı. Üzerlerine 10 µl BALP antikoru konuldu. Daha sonra 50 µl Streptavidin-HRP eklendi.
4. Örneklerin üzeri kapatılıp 37⁰C'de 60 dakika inkübasyona bırakıldı.
5. Yıkama solüsyonu 30 defa sulandırıldı. Kuyucuklar bir dakika arayla 5 kez distile su ile yıkandı.
6. Tüm kuyucuklara 50 µl Kromojen ve 50 µl Kromojen B eklendi.
7. Karanlık ortamda 37⁰C'de 10 dakika inkübe edildi.
8. Tüm kuyucuklara 50 µl stop solüsyonu konuldu.
9. 450 nm dalga boyunda okunan örneklerin sonuçları standartlara göre belirlendi.

3.2.10 İstatistiksel Değerlendirme

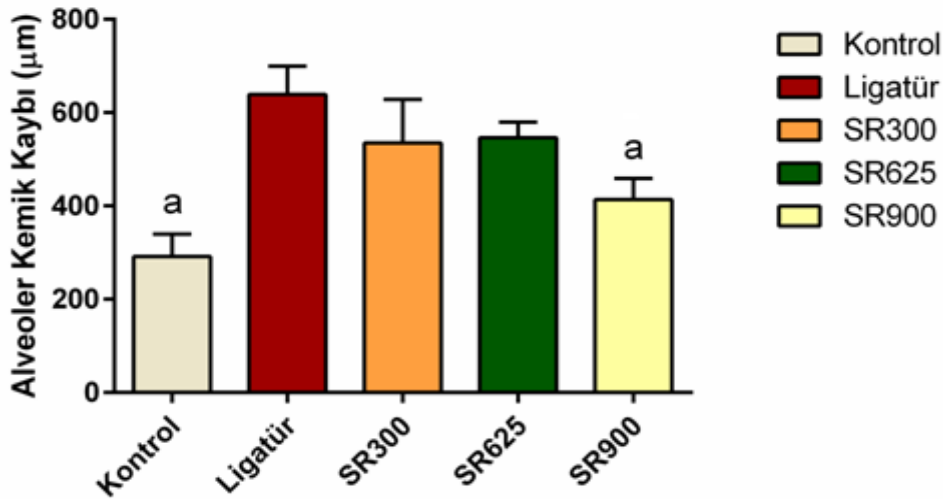
Çalışmamızın verileri SPSS (Ver:22.0) (IBM Corporation, Amerika Birleşik Devletleri) programına yüklenerek istatistiksel analiz yapıldı. Kolmogorov-Smirnov testine göre alveoler kemik kaybı, OPG ve BALP verilerinin dağılımları normallik gösterdiği için bu verilerle ilgili olarak, parametrik test olan tek yönlü varyans analizi uygulandı. IL-1 β , osteoblast, osteoklast sayıları, enflamatuvar infiltrasyon ve RANKL değerlerinin değerlendirilmesinde parametrik test varsayımları yerine getirilemediğinden Kruskal-Wallis testi ve Mann-Whitney U testi kullanıldı. Verilerimiz tablolarda aritmetik ortalama \pm standart sapma, minimum, maksimum ve ortanca olarak belirtilip yanılma düzeyi 0.05 olarak alındı.

4. BULGULAR

Deney süresi boyunca ratların molar dişlerine yerleştirilen ligatürlerde herhangi bir ayrılma veya kopma, ratlarda ilaca bağlı yan etki gözlenmedi. SR900 grubundaki 1 adet ratta enfeksiyona bağlı kayıp gerçekleşti. Bu grupta çalışma sonunda 7 adet rat yer aldı.

4.1 Morfometrik Ölçümler

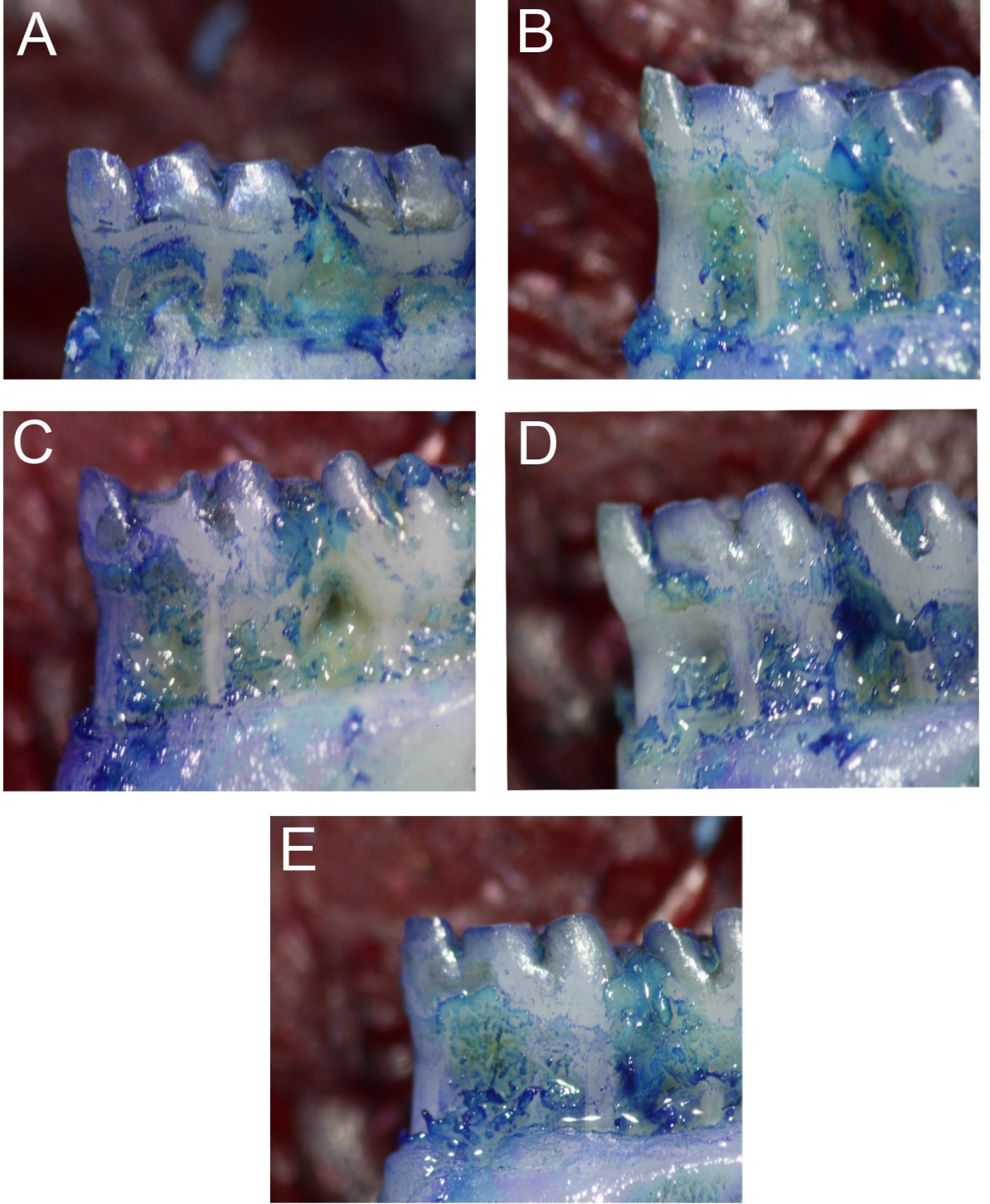
Gruplara ait alveoler kemik kaybı ölçümleri karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edildi ($p<0.05$) (Şekil 4.1) (Çizelge 4.1). Kontrol grubundaki alveoler kemik kaybı miktarı diğer tüm gruplardan anlamlı olarak daha az bulundu ($p<0.05$). Ligatür grubu ile SR grupları alveoler kemik kaybı bakımından karşılaştırıldığında, yalnızca SR900 grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenirken ($p<0.05$), ligatür grubu ile SR300 ve SR625 grupları arasında istatistiksel olarak bir farka rastlanmadı ($p>0.05$). Ayrıca SR900 grubundaki alveoler kemik kaybı, SR300 ve SR625 gruplarına oranla anlamlı düzeyde düşüktü ($p<0.05$) (Şekil 4.2).



Şekil 4.1 Gruplara ait alveoler kemik kaybı ortalamaları
^a $p<0.05$ diğer tüm gruplardan farklı.

Çizelge 4.1 Gruplara ait alveoler kemik kaybı düzeyleri (μm)

| Gruplar | Ort+SD | (Min-Maks) Ortanca |
|----------------|---------------------------------|---------------------------|
| Kontrol | 291,87±47,48^a | (245-368) 277 |
| Ligatür | 639,12±60,66 | (568-739) 628 |
| SR300 | 535,25±92,87 | (384-718) 522,50 |
| SR625 | 546,62±33,26 | (487-589) 557,50 |
| SR900 | 413,57±45,39^b | (357-471) 420 |

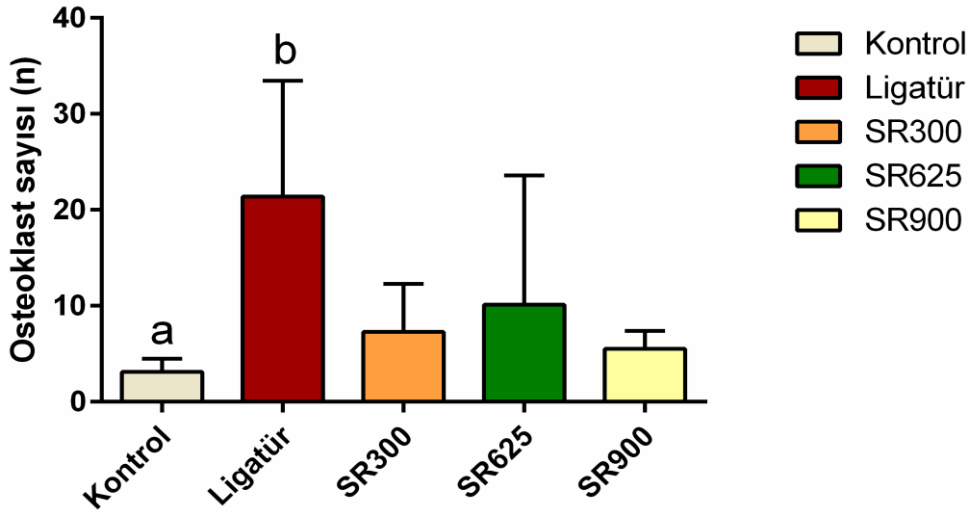


Şekil 4.2 Gruplara ait sağ alt 1. molar dişlerin stereomikroskop görüntüsü (16x)
A: Kontrol grubu, B: Ligatür grubu, C: SR300 grubu, D: SR625 grubu, E: SR900 grubu

4.2 Histopatolojik Değerlendirmeler

Osteoklastik Aktivite

Gruplardaki osteoklast sayısı dağılımları Şekil 4.3'te belirtilmiş olup, osteoklastik aktivite bakımından en yüksek ortalamayı ligatür, en düşük ortalamayı ise kontrol grubu gösterdi ve gruplar arasındaki bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$) (Şekil 4.5-A, B). Ligatür grubunda, kontrol, SR300 ve SR900 gruplarına göre anlamlı olarak daha fazla osteoklast saptandı ($p<0.05$). SR625 grubundaki osteoklastik aktivitenin ligatür grubuna göre daha az olmasına rağmen bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$).



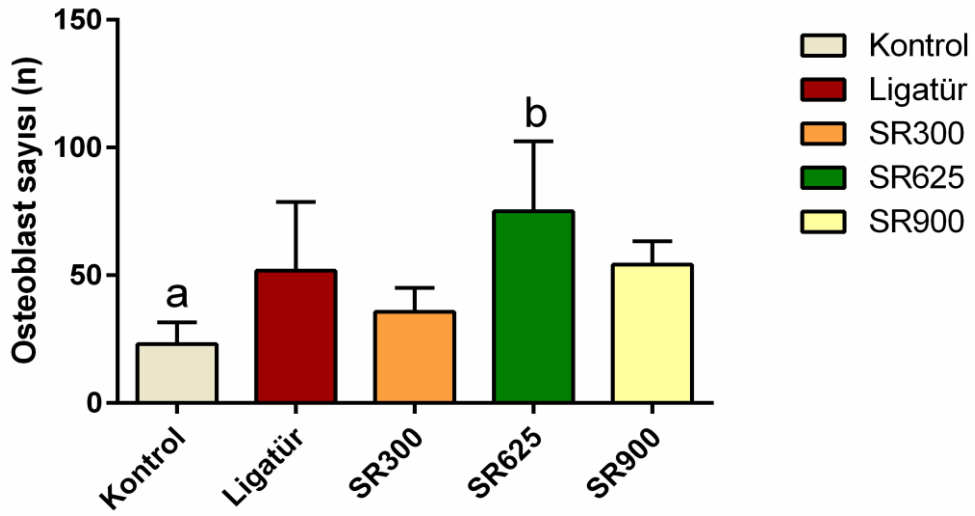
Şekil 4.3 Gruplara ait osteoklast sayısı dağılımı (n)

^a $p<0.05$ ligatür grubundan farklı.

^b $p<0.05$ SR300 ve SR900 gruplarından farklı.

Osteoblastik Aktivite

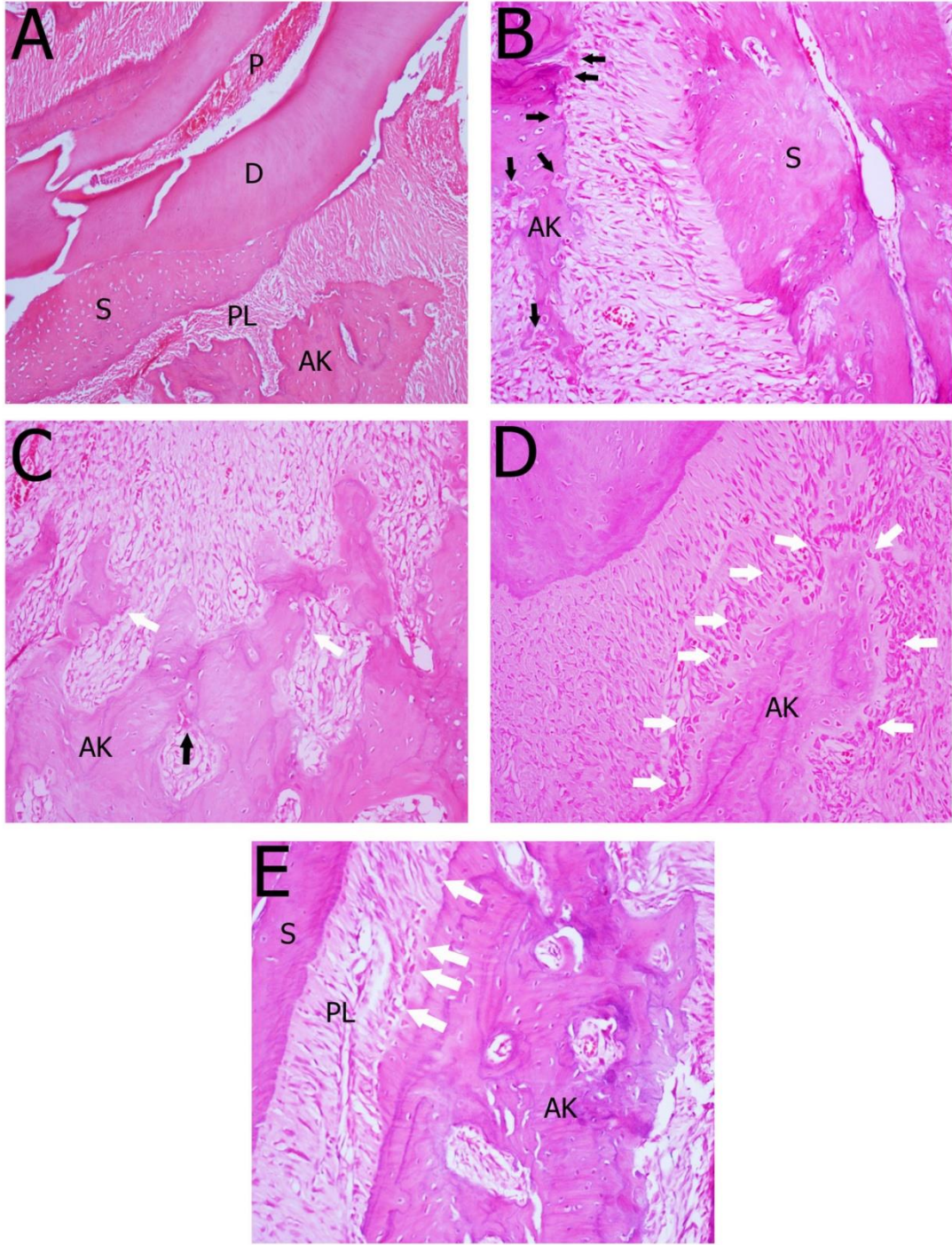
Gruplardaki osteoblast sayısı dağılımları Şekil 4.4'te gösterilmiş olup gruplar arasındaki farklılıklar anlamlı bulundu ($p < 0.05$). Kontrol grubu ile ligatür, SR625 ve SR900 grupları arasında ve ayrıca SR300 ile SR625 grupları arasındaki farklılıklar anlamlı bulunurken ($p < 0.05$), diğer gruplar arasındaki farklılıklar anlamlı bulunmadı ($p > 0.05$) (Şekil 4.5-C, D, E). Ligatür grubuna göre SR625 ve SR900 gruplarında daha fazla osteoblast saptanmasına karşın bu farklılıklar anlamlı bulunmadı ($p > 0.05$).



Şekil 4.4 Gruplara ait osteoblast sayısı dağılımı (n)

^a $p < 0.05$ ligatür, SR625 ve SR900 gruplarından farklı.

^b $p < 0.05$ SR300 grubundan farklı.



Şekil 4.5 Gruplara ait histolojik kesitler

A: Kontrol grubundaki bir örnekte pulpa, dentin, sement, periodontal ligament ve alveoler kemik ilişkisi görülmektedir (100x).

B: Ligatür grubundaki bir örnekte osteoklastik aktivite (siyah ok) gözlenmektedir (200x).

C: SR300 grubundaki bir kesitte sınırlı düzeydeki osteoklastik aktivite (siyah ok) ve osteoblastik hücreler (beyaz ok) görülmektedir (200x).

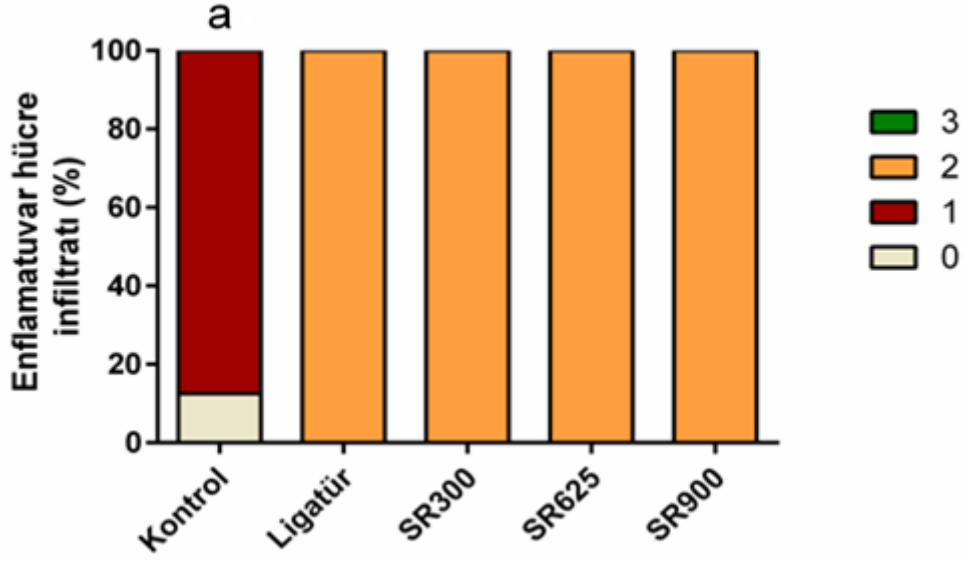
D: SR625 grubuna ait örnekte yoğun osteoblastik aktivite (beyaz ok) (200x).

E: SR900 grubunda görülen osteoblastik aktivite (beyaz ok) (200x).

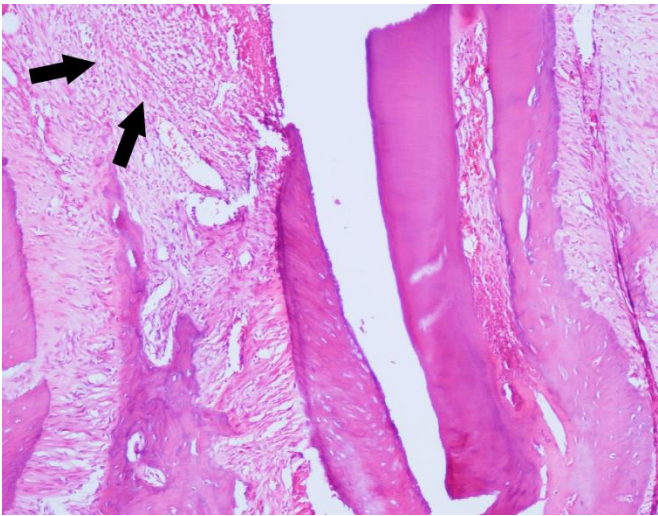
AK: alveoler kemik, PL: periodontal ligament, D: dentin, P: pulpa, S:sement.

Enflamatuvar Hücre İnfiltratı

Gruplardaki enflamatuvar hücre infiltratı dağılımları karşılaştırıldığında, kontrol grubu ile diğer tüm gruplar arasındaki farklılıklar anlamlı bulunurken ($p<0.05$) (Şekil 4.6), diğer gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$) (Şekil 4.7).



Şekil 4.6 Gruplardaki enflamatuvar hücre infiltratı dağılımı (%)
^a $p<0.05$ diğer tüm gruplardan farklı.

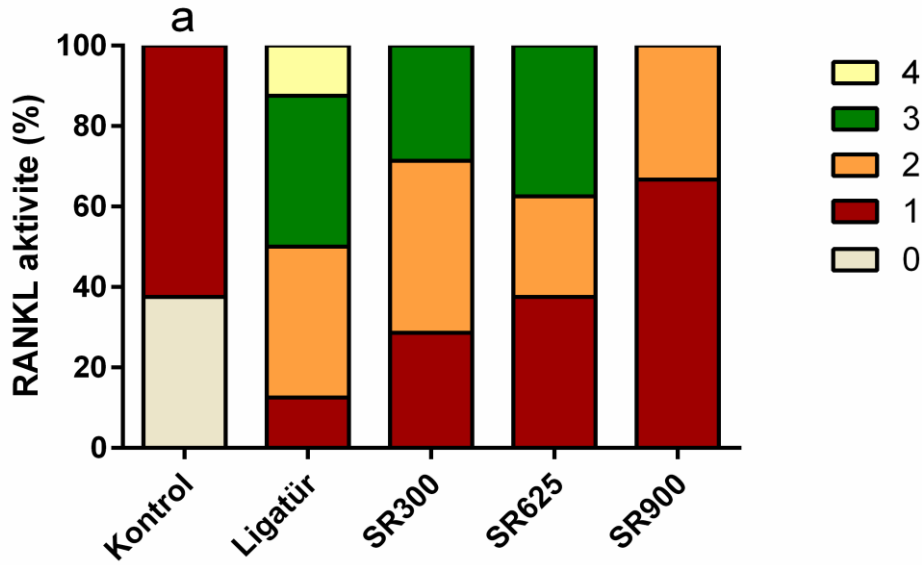


Şekil 4.7 Ligatür grubuna ait bir örnekte yoğun enflamatuvar hücre infiltratı alanı

4.3 İmmünohistokimyasal Analizler

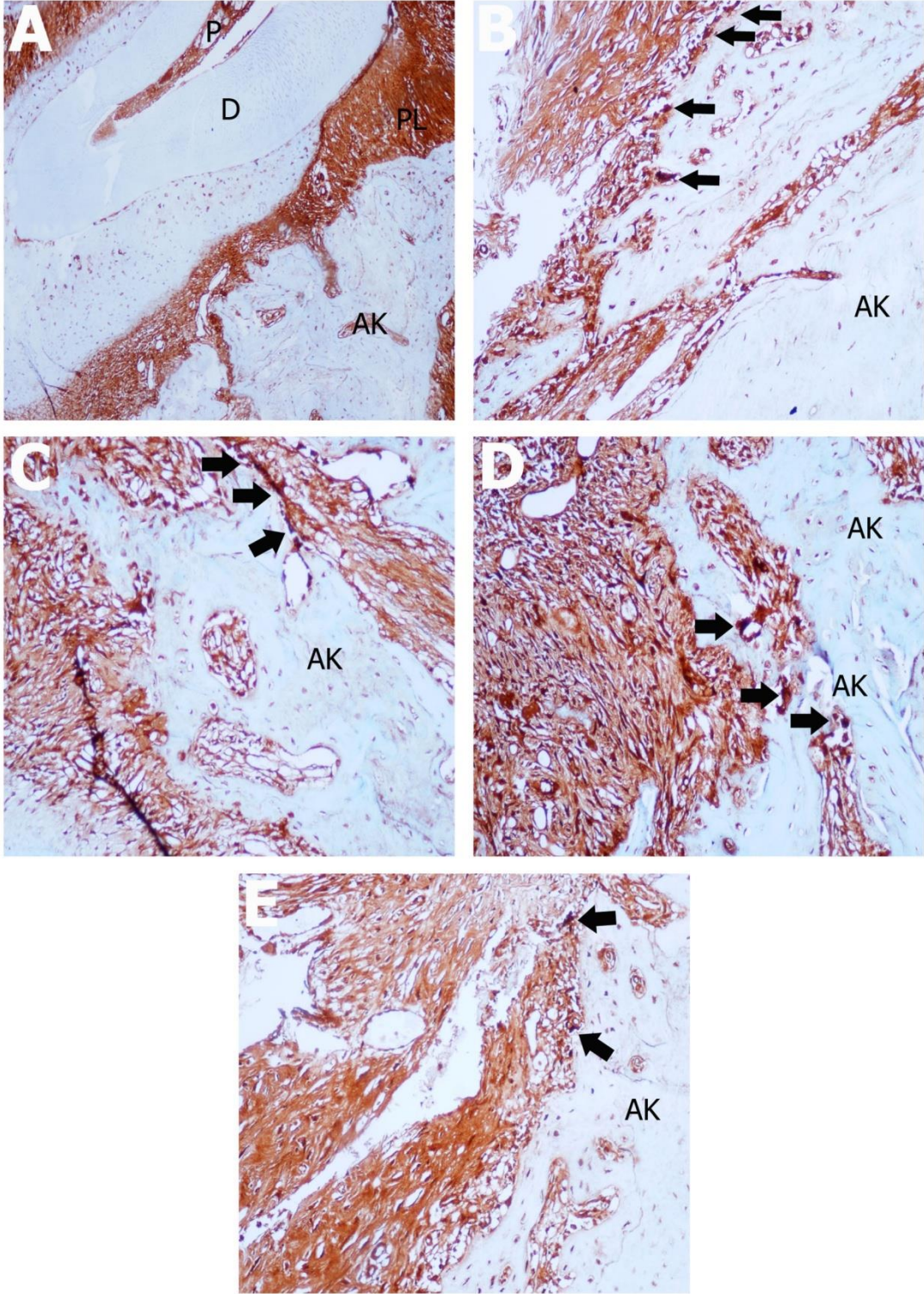
RANKL İmmünohistokimyasal Değerlendirme

RANKL aktivitesine göre gruplar karşılaştırıldığında anlamlı farklılıklar bulundu ($p<0.05$) (Şekil 4.8). Kontrol grubu ile ligatür, SR300 ve SR625 grupları arasındaki farklılıklar anlamlı bulunurken ($p<0.05$), diğer gruplar arasındaki farklılıklar anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). RANKL aktivitesi SR900 grubunda SR 300 ve SR625 gruplarına göre daha düşük çıktı, ancak bu fark anlamlı bulunmadı ($p>0.05$) (Şekil 4.9-C, D). SR gruplarının ortalama değerlerinin ligatür grubundan daha düşük bulunmasına rağmen bu farklılıklar anlamsız bulundu ($p>0.05$) (Şekil 4.9-B). Kontrol ile SR900 grupları arasında RANKL aktivitesi bakımından fark görülmedi ($p>0.05$) (Şekil 4.9-A, E).



Şekil 4.8 Gruplara ait RANKL aktivitesi dağılımı (%)

^a $p<0.05$ kontrol grubu, ligatür, SR300 ve SR625 gruplarından farklı.



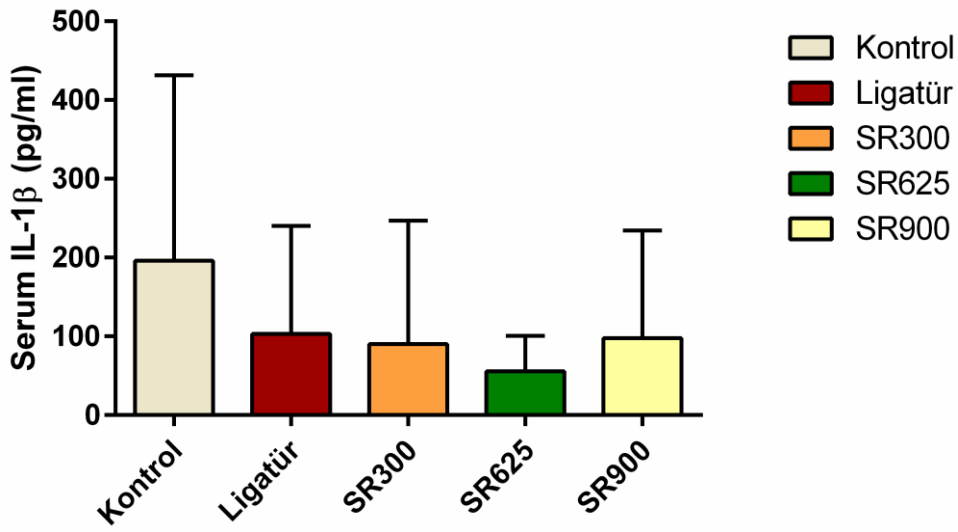
Şekil 4.9 Gruplara ait RANKL immünohistokimyasal boyama görüntüleri

A: Kontrol grubu (100x), B: Ligatür grubu (200x), C: SR300 grubu (200x), D: SR625 grubu (200x), E: SR900 grubu (200x). Kontrol grubunda RANKL aktivitesi gözlenmezken en yoğun RANKL aktivitesi ligatür grubunda görüldü. SR900 grubundaki RANKL aktivitesi kontrol grubuna yakın bulundu.

4.4 Biyokimyasal Analizler

4.4.1 IL-1 β Düzeyi

Ratlardan alınan serum örneklerindeki IL-1 β ELİZA analiz sonuçları değerlendirildiğinde, SR gruplarındaki sitokin değerleri kontrol ve ligatür gruplarından daha düşük çıkmasına rağmen bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$) (Şekil 4.10) (Çizelge 4.2).



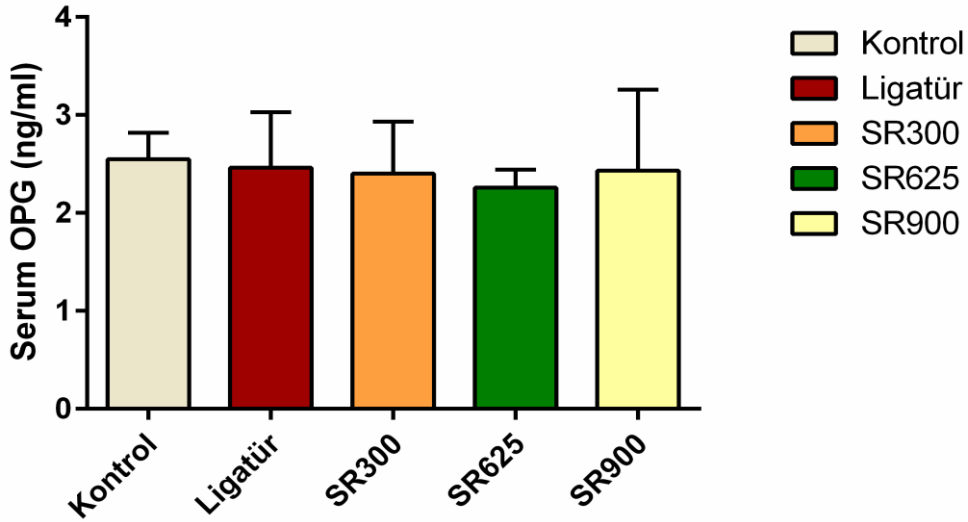
Şekil 4.10 Gruplara ait serum IL-1 β dağılımı

Çizelge 4.2 Gruplara ait serum IL-1 β düzeyleri (pg/ml)

| Gruplar | Saptanma Oranları (%) | Ort+SD | (Min-Maks) Ortanca |
|---------|-----------------------|---------------|--------------------|
| Kontrol | 87,5 | 195,85±235,55 | (18-589) 94 |
| Ligatür | 100 | 103,25±137,01 | (13-346) 31 |
| SR300 | 100 | 90±156,68 | (13-468) 15 |
| SR625 | 100 | 55,75±45,06 | (8-131) 55 |
| SR900 | 100 | 97,85±136,64 | (8-384) 48 |

4.4.2 OPG Düzeyi

Ratlardan alınan serum örneklerindeki OPG ELISA analiz sonuçları değerlendirildiğinde, gruplar arasında istatistiksel olarak anlam ifade eden herhangi bir bulguya rastlanmadı ($p>0.05$) (Şekil 4.11) (Çizelge 4.3).



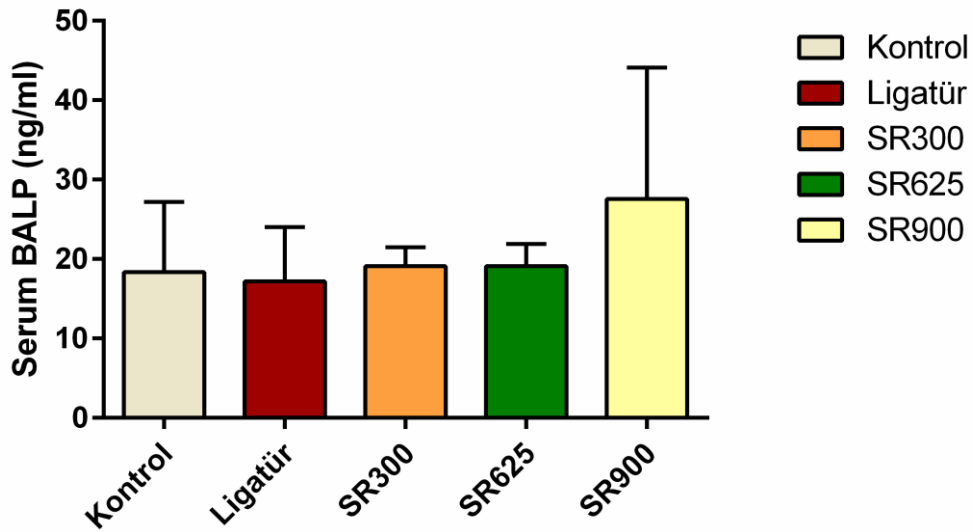
Şekil 4.11 Gruplara ait serum OPG dağılımı

Çizelge 4.3 Gruplara ait serum OPG düzeyleri (ng/ml)

| Gruplar | Saptanma Oranları (%) | Ort+SD | (Min-Maks) Ortanca |
|---------|-----------------------|-----------|--------------------|
| Kontrol | 87,5 | 2,55±0,27 | (2,21-3,05) 2,53 |
| Ligatür | 100 | 2,46±0,57 | (1,88-3,79) 2,36 |
| SR300 | 100 | 2,40±0,53 | (1,59-3,48) 2,44 |
| SR625 | 100 | 2,26±0,18 | (1,99-2,55) 2,26 |
| SR900 | 100 | 2,43±0,83 | (1,01-3,86) 2,50 |

4.4.3 BALP Düzeyi

Ratlardan alınan serum örneklerindeki BALP ELISA analiz sonuçlarına göre, SR300 ve SR625 gruplarının değerleri, ligatür ve kontrol gruplarından daha yüksek çıkmasına rağmen bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). Yine SR900 grubundaki BALP serum düzeyinin diğer tüm gruplardan yüksek bulunmasına rağmen bu değerler istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$) (Şekil 4.12) (Çizelge 4.4).



Şekil 4.12 Gruplara ait serum BALP dağılımı

Çizelge 4.4 Gruplara ait serum BALP düzeyleri (ng/ml)

| Gruplar | Saptanma Oranları (%) | Ort+SD | (Min-Maks) Ortanca |
|---------|-----------------------|-------------|---------------------|
| Kontrol | 87,5 | 18,34±8,86 | (0,20-28,97) 20,14 |
| Ligatür | 100 | 17,17±6,83 | (0,30-20,02) 19,62 |
| SR300 | 100 | 19,09±2,38 | (15,16-22,45) 18,83 |
| SR625 | 100 | 19,09±2,80 | (14,07-23,48) 19,06 |
| SR900 | 100 | 27,55±16,57 | (19,62-65) 21,42 |

5. TARTIŞMA

Periodontal hastalık birçok faktörle modifiye edilebilmesine rağmen primer etiyolojik faktör mikrobiyal dental plakdır [36]. Ancak periodontal doku yıkımının başlamasında mikrobiyal dental plak tek başına yeterli olmamaktadır. Mikrobiyal dental plağın oluşumu ile ilgili olarak uyarılan antijenler hücresel ve hümoral bağışıklık sisteminin aktive olması ile bir dizi olayların başlamasına ve sonuçta da periodontal doku yıkımının gerçekleşmesine yol açmaktadır [146]. Periodontal hastalık sürecinde hem bakterilerden (endotoksin, bakteriyal hyaluronidazlar) hem de konak hücresinden (kollajenazlar, proteazlar) salınan enzimler periodontal dokuların yıkımına neden olur. Özetle periodontal doku yıkımı subgingival alandaki bakterilere karşı verilen savunma ile başlar. Bu savunma sürecinde meydana gelebilen bakterilerin üstünlüğü sonucunda periodontal doku yıkımı ilerler [8].

Periodontitis tedavilerinde mekanik tedaviye ek olarak bazı ajanların kullanımı son yıllarda yapılan çalışmalarda gündeme gelmiştir [114, 147-149]. SR, temel olarak osteoporoz tedavisinde kullanılan anti-rezorptif ve aynı zamanda kemik formasyonunun sürekliliğini sağlayan bir preparattır [115]. Çalışmamızda da SR'nin bu temel özelliğinden yararlanılarak ratlarda oluşturulan deneysel periodontitis modelinde alveoler kemik yıkımına etkisi morfolometrik olarak değerlendirildi. Histopatolojik ve immünohistokimyasal incelemeler yapıldı buna ek olarak serumdaki IL-1 β , OPG ve BALP düzeylerine bakıldı.

Daha önce gerçekleştirilen birçok deneysel çalışmada ratlarda ligatür kullanımı, plak retansiyon alanı ve dolayısıyla periodontitis oluşumu için kullanılmıştır [25, 150-153]. Ligatürlü periodontitis modelinde doku yıkımı kronik periodontitisten farklı olarak akut bir süreç gösterir [154]. Ayrıca ligatür yerleştirilmesini takiben dişlerde oklüzal, bukkal ve distal yönde migrasyon olabileceği için ligatürle deneysel periodontitis oluşturma süreci 15 günü geçmemelidir. Aksi halde yıkım şiddeti önemli ölçüde azalabilmektedir [60]. Çalışmamızda ratların dişlerine ligatür yerleştirildikten 11 gün sonra sakrifikasyon gerçekleştirilmiştir. Daha önceki çalışmalarda da en yoğun kemik kaybının ligatür yerleştirildikten sonra 11. günde görüldüğü belirtilmiştir [25,

150, 152, 153]. Bizim çalışmamızda da ratlarda ligatür kullanımının ligatür çevresindeki alveoler kemik yıkımını arttırdığı gözlemlendi.

Ratlarda molar dişler oklüzal yüzeylerdeki atrizyona bağlı olarak sürekli erüpsiyona uğrar ve buna bağlı olarak alveoler kemikte remodeling gerçekleşir [155]. Periodontal hastalığın olmadığı durumlarda bukkal yüzeylerde mine-sement sınırı ve alveoler kemik kreti arasındaki uzaklık aynı kalırken, palatinal ve lingual bölgelerde bu iki nokta arasındaki uzaklık yaşa bağlı olarak artar [156]. Bu nedenle çalışmalarda aynı yaşa sahip ratlar kullanılmalıdır. Bizim çalışmamızda da 12 haftalık erkek Wistar ratlar kullanıldı.

Alveoler kemik kaybının hesaplanmasında açıktaki kök yüzey alanının belirlenmesi veya bu çalışmada olduğu gibi 6 farklı noktadan mine-sement birleşim noktasından alveoler kret tepesine kadar olan uzaklığın ölçülmesi kullanılabilir. Ligatür yerleştirilmesinden 15 gün sonra her iki yöntemin de benzer sonuçlar verdiği belirtilmiştir. Bununla birlikte erken dönemdeki kemik kaybını alan ölçümün daha net belirleyebildiği; ancak 60 gün sonra uzaklık ölçümünün daha güvenilir sonuçlar verdiği öne sürülmüştür [60]. Çalışmamızda uzaklık ölçümü yöntemi kullanıldı. İstatistik verileri sonucunda, beklenildiği gibi ligatür grubunda kontrol grubundan anlamlı olarak daha çok kemik yıkımı saptandı. Deney gruplarında da yine kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha çok kemik kaybının olduğu tespit edildi. Ayrıca ligatür grubu ile SR300 ve SR625 grupları arasında fark görülmezken, SR900 grubunda ise kemik kaybı miktarında anlamlı azalma gözlemlendi. Buna göre sistemik olarak uygulanan SR'nin doza bağlı olarak deneysel periodontitis modelindeki alveoler kemik yıkımını azalttığı söylenebilir.

Çalışmamızda ratlara verilen SR dozlarını belirlemek için günümüze kadar yapılmış olan birçok çalışma incelendi. İnsanlarda bu maddenin günlük önerilen toksik olmayan en etkili dozu günlük 2 gr olarak saptanmıştır. Ratlara uygulanan 625 mg/kg'lık dozun, insandaki 2 gr'lık dozun kandaki konsantrasyonuna eşdeğer olduğu belirtilmiştir. Aradaki farkın, ratlarda stronsiyumun intestinal emiliminin daha az olmasından kaynaklandığı öne sürülmüştür [157]. Yaklaşık 308 mg/kg'lık dozun SR'nin antirezorptif etkilerinin görülebilmesi için gerekli olan minimum etkili doz olduğu belirtilmiştir [158, 159]. Yine bazı deneysel çalışmalarda 900 mg/kg ratlara verilen en yüksek doz olarak kullanılmıştır [123, 160]. SR'nin ortodontik ankrajı arttırmaya

yönelik kullanıldığı bir çalışmada yine 900 mg/kg günlük doz ratlara verilmiştir [127]. Camcıoğlu ve arkadaşlarının [161] yaptıkları bir çalışmada ise ovariektomize ratlarda kemik mineral yoğunluğuna SR'nin ekisi incelenmiş ve 1800 mg/kg'lık doz kullanılmıştır. Bu çalışmada da hayvanlarda herhangi bir olumsuz etkinin görülmediği rapor edilmiştir. Daha önce SR'nin periodontitise etkisiyle ilgili benzer bir deneysel çalışma yapılmadığı için çalışmamızdaki dozlar bu çalışmalara göre belirlendi ve ratlarda çalışma süresince ilaca bağlı herhangi bir olumsuz etki gözlenmedi.

SR'nin, daha önceki deneysel çalışmalarda kullanılan bifosfonatlara göre, kemik rezorpsiyonu inhibe ederken aynı zamanda kemik formasyonunu da stimüle etmesinden dolayı bir avantajı bulunmaktadır [158]. Bifosfonatlar ise kemik formasyonunu osteoblastik aktiviteyi etkileyerek % 50'ye kadar azaltabilmektedir [162]. Buehler ve arkadaşları [34] maymunlar üzerinde yaptıkları çalışmada 6 aylık SR uygulamaları sonucunda osteoklast yüzey ve sayısındaki azalmayla birlikte alveoler kemik rezorpsiyonunun da azaldığını ve kemik formasyonunun aynı şekilde devam ettiğini gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar ratlar üzerinde gerçekleştirilen deneysel çalışmalarda SR'nin kemiğin biyomekanik özelliklerini ve mikromimari yapısını geliştirdiğini tespit etmişlerdir [157, 163, 164]. Ammann ve arkadaşlarının [160] yaptığı bir çalışmada 2 yıl süresince uygulanan 900 mg/kg günlük dozun ratlarda vertebral kemik kalitesini önemli derecede arttırdığı belirtilmiştir. Zacchetti ve arkadaşları [165] da, rat tibialarına açılan defektlere haftanın 5 günü günlük 625 mg/kg SR'yi 4, 8 ve 12 hafta süreyle uygulamışlar, 8 ve 12 haftalık gruplarda kontrol grubuna göre trabeküler mikroyapıda önemli gelişim olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca kortikal kemiğin defekt alanındaki gelişimi ise 4. haftadan itibaren önemli derecede gözlenir hale gelmiştir.

Fuchs ve arkadaşlarının [166] yaptıkları çalışmada SR'nin 25 mg/kg ve 150 mg/kg günlük dozlarının ovariektomize ratlarda 90 gün sonra kemik biyomekanik özelliklerinde önemli bir etkiye yol açmadığı ve SR'nin kemik rezorpsiyonunu önlemede yetersiz olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca kemik formasyonunda herhangi bir artış tespit edilmemiştir. Bu durumun SR'nin bu çalışmadaki düşük dozlarından kaynaklandığı söylenebilir.

Maimoun ve arkadaşlarının [163] yaptıkları bir çalışmada, haftanın 5 günü uygulanan günlük 625 mg/kg dozun 8 haftada ratlarda implant osseointegrasyonunu ve kemik mikroyapısını geliştirdiği belirtilmiştir. Li ve arkadaşları [164] osteoporotik

ratlarda yaptıkları çalışmalarında hidroksiapatit kaplı titanyum vidalarda osseointegrasyonun, fiksasyonun ve çevredeki kemik özelliklerinin 12 haftalık SR uygulamasıyla birlikte geliştiğini saptamışlardır. Yine aynı SR'nin 1000 mg/kg günlük dozu önemli derecede etkili olmakla birlikte 500 mg/kg'lık dozu da anlamlı olarak yarar sağlamıştır.

SR'nin implant osseointegrasyonuna olumlu etkisini rapor eden çalışmaların aksine Linderback ve arkadaşlarının [167] yaptığı deneysel bir çalışmada günlük 800 mg/kg SR'nin kemik yoğunluğuna ve mikroyapısına olumlu etkisinin olmasına rağmen, 4 veya 8 haftalık implant erken dönem fiksasyonuna önemli bir etkisinin olmadığı öne sürülmüştür. Bununla birlikte Chen ve arkadaşları [168] tarafından ovariektomize ratlarda implant osseointegrasyonuna ve kemik mineral yoğunluğuna zoledronik asidin, SR ve alendronattan daha olumlu etkisinin olduğu rapor edilmiştir.

Enfeksiyonlara karşı oluşan akut faz yanıtı, TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi enflamatuvar mediyatörlerin salınmasına öncülük eden lokal makrofajların ve diğer bazı hücrelerin aktive edilmesiyle başlamaktadır [169]. Çalışmamızda incelenmek üzere bu enflamatuvar mediyatörlerden IL-1 β tercih edildi. Yüksek IL-1 β düzeyi periodontal dokulardaki enflamasyonun önemli bir belirteçidir [170]. Ayrıca artmış düzeyde IL-1 β düzeyleri ileri periodontal hastalık patogeneğinde önemli rol oynar [171, 172].

Buduneli ve arkadaşları [173] *Escherichia coli* endotoksininden elde edilen saflaştırılmış lipopolisakkarit enjeksiyon yöntemi ile deneysel periodontitis oluşturmuşlardır. Bu yöntemle ligatür yönteminde olduğu gibi önemli miktarda alveoler kemik yıkımı oluşturulmuştur. Doksisisiklinle birlikte veya tek başına ratlara verilen alendronatın kemik yıkımını önemli ölçüde azalttığı belirtilmiştir. Bununla birlikte serum IL-1 β düzeyleri doksisisiklin ve/veya alendronat verilen gruplarda anlamlı olarak daha yüksek çıkmıştır. Bu durumun lipopolisakkaritin bölgeye lokal olarak uygulanıp bir döngü sonucu bölgeye kendiliğinden yerleşmemesinden dolayı oluşabileceği belirtilmiştir. Buna ek olarak başlangıçtaki değişimlerin deneyin sonuna doğru ortadan kalkabileceği öne sürülmüştür. Kronik periodontitis hastalarında başlangıç tedavisinden sonra azalan plak ve kanama indeksleri ve sondlama derinliklerindeki düşüşün aksine sistemik C-reaktif protein, IL-1 β , IL-6, and TNF- α düzeylerinin önemli ölçüde değişmediği gözlenmiştir [174, 175]. Murata ve arkadaşları [176] sağlıklı ve peri-implantitisli hastalarda, peri-implant dişeti oluğu sıvısında ve serumda osteokalsin ve

IL-1 β parametrelerini değerlendirmişlerdir. Sonuç olarak bu parametrelerin lokal olarak üretildiğini ve lokal olarak üretilen bu maddelerin sistemik düzeyi önemli ölçüde etkilemeyeceğini öne sürmüşlerdir. Buna göre lokal olarak üretilen IL-1 β 'nın sistemik olarak önemli derecede yüksek bir düzeye ulaşması için beklenilenden daha yüksek miktarda üretilmesinin gerektiği söylenebilir. Bununla birlikte Gorska ve arkadaşları [177] periodontitisli bireylerde serum IL-1 β konsantrasyonunun sağlıklı kontrollere göre daha yüksek düzeyde olduğunu belirtmişlerdir. Fernandez ve arkadaşları [178] farelerin osteoblastik hücre kültüründe yaptıkları çalışmada IL-1 ve TNF- α düzeylerinin SR uygulamasıyla birlikte azaldığını gözlemlemişlerdir. Bizim çalışmamızda ise gruplar arasında serum IL-1 β değerleri bakımından anlamlı bir farklılık saptanmadı.

Deneysel periodontitis modellerinde ligatür kullanılması ile osteoklast sayısında artış ve enflamatuvar infiltrasyon oluşumu başarı ile sağlanmıştı [152, 153]. Çalışmamızda da ligatür kullanımı osteoklast sayısında artışa yol açtı. SR kullanımıyla azalan osteoklast sayısına paralel olarak alveoler kemik kaybı miktarı da SR gruplarında düşüş gösterdi. Enflamatuvar infiltrasyon miktarı ise kontrol grubuna göre diğer tüm gruplarda ligatür yerleştirilmesine bağlı olarak benzer şekilde artış gösterdi. Osteoblast sayıları bakımından en yüksek değerler SR625 ve SR900 gruplarında gözlemlendi. Bununla birlikte ligatür grubunun osteoblast sayısı dağılımı kontrol ve SR300 gruplarından daha yüksek bulundu. Benzer şekilde Sağlam ve arkadaşlarının [152, 153] yapmış oldukları çalışmalarda da osteoblast sayılarının ligatür gruplarında yükseldiğini gözlemlendi. Bu durumun ligatür yerleştirilmesine bağlı olarak artan osteoklast sayısına reaksiyon olarak turnover'nin sürekliliği için meydana geldiğini düşünmekteyiz.

Normal koşullar altında kemik yapım ve yıkımı arasında bir denge bulunmaktadır. Bu denge RANKL/OPG oranı ile ilişkilidir. Periodontal kemik rezorpsiyon ve formasyonu RANKL, osteoklast öncü hücrelerinde bulunan RANKL reseptörü RANK ve OPG tarafından düzenlenmektedir. RANKL'in dokulardaki düzeyi yükseldiğinde osteoklast öncü hücrelerindeki RANK ile bağlanarak osteoklastik aktivite ile birlikte kemik rezorpsiyonu meydana gelmektedir. OPG düzeyi RANKL düzeyinden fazla olduğu zaman OPG RANKL'a bağlanarak RANK ile bağlanmasına engel olmaktadır. RANKL'in RANK ile bağlanması engellenerek osteoklast oluşumu azalarak osteoklastik apoptozis artmaktadır [179]. Bazı çalışmalarda periodontitisli bireylerde serum OPG düzeylerinde fark olmaksızın RANKL düzeylerinin sağlıklı bireylerden

daha yüksek olduğu belirtilmiştir [81, 180]. Bununla birlikte genellikle RANKL miktarının artması OPG miktarındaki azalma ile birlikte meydana gelmektedir. IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-11, IL-17, TNF- α gibi bazı sitokinler RANKL üretimini arttırarak etki göstermektedir [181]. Bizim sonuçlarımıza paralel olarak ligatürle oluşturulan deneysel periodontitis modellerinde RANKL üretiminin arttığı belirtilmiştir [152, 153]. Bizim çalışmamızda ise IL-1 β ve OPG dağılımları bakımından gruplar arasında önemli bir farklılık görülmezken SR900 grubundaki RANKL aktivitesi kontrol grubuna yakın bulundu.

İnsan osteoblast hücre kültürleri üzerinde yapılan bir çalışmada OPG/RANKL oranı SR'nin 1, 5, ve 10 milimol olan farklı dozlarında artmıştır. Buna ek olarak osteoblast aracılı osteoklastogenezis SR uygulanmaları ile inhibe edilmiştir [122]. Bu çalışmaya paralel olarak Brennan ve arkadaşlarının [119] yaptığı bir çalışmada SR, osteoblastların hücre replikasyon ve diferasyonunu, ayrıca OPG mRNA ve protein miktarını arttırmıştır. RANKL mRNA ve protein miktarını ise azaltmıştır. Stronsiyum yüklü mezoporoz biyoaktif cam iskeletin osteoporotik ratlarda histopatolojik olarak osteoklast sayısını anlamlı olarak azalttığı bildirilmiştir [182]. Wu ve arkadaşlarının [183] yaptıkları bir çalışmada bu cam iskeletin periodontal ligament hücre kültüründe osteogenezis ve sementogenezisi önemli ölçüde arttırdığı bulunmuştur.

Osteoblastik aktiviteyi ve osteoid mineralizasyonunu gösteren BALP, kemik yapım metabolizmasının saptanmasında kullanılan en önemli belirteçlerden bir tanesidir [90]. Alendronatın alveoler kemik kaybına BALP üzerinden etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, deneysel periodontitis oluşumuyla indüklenen kemik kaybı ve serum BALP miktarındaki düşüş alendronatla önlenbilmiştir [25]. Du ve arkadaşları [91] simvastatinin osteoporotik ratlarda implant osseointegrasyonuna etkisini araştırmışlar ve simvastatinin osseointegrasyondaki olumlu etkisinin yanında serum BALP miktarı ile osseointegrasyon derecesi arasında bir korelasyon kurulabileceğini belirtmişlerdir. Ammann ve arkadaşları [123] 2 yıl süresince günlük 625 mg/kg SR uygulanan ratlarda plazma total ALP düzeyinde önemli artış tespit etmişlerdir. Çalışmamızda gruplar arası serum BALP düzeyleri bakımından istatistiksel olarak anlam ifade eden bir farka rastlanmadı. Bununla birlikte SR verilen gruplarda ligatür grubuna göre daha yüksek değerler saptandı. BALP düzeyi açısından en yüksek ortalama değer SR900 grubunda görüldü.

Meunier ve arkadaşları [184] günlük 2 gram SR kullanan osteoporozlu post-menopozal bayanlarda serum BALP düzeylerinde önemli miktarda artış olduğunu saptamışlardır. Meunier ve arkadaşları [185] başka bir çalışmada, post-menopozal bayan hastalarda SR'nin kontrol grubuna göre serum BALP aktivitesini arttırdığını ve serum C-telopeptit çapraz bağlarının miktarını azalttığını göstermişlerdir.

Fernandez ve arkadaşları [126] hücre kültürü üzerinde yaptıkları bir çalışmada SR'nin BALP aktivitesini çinko ve magnezyum ile etkileşime girerek arttırdığını belirtmişlerdir. SR'nin 10 mg/ml üstü dozlarda periodontal ligament hücreleri üzerinde sitotoksik etkisininin olabileceği bildirilmiş [186], ve bununla birlikte farklı çalışmalarda stronsiyum yüklü mezoporoz biyoaktif cam iskeletin periodontal doku rejenerasyonuna katkı sağladığı öne sürülmüştür [182, 183]. Buna paralel olarak stronsiyumun periodontal ligament hücrelerindeki proliferasyonu arttırıp IL-6 üretimini baskıladığı belirtilmiştir [129].

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamızın sınırları dahilinde;

- Ligatürle oluşturulan deneysel periodontitis modeli ratlarda alveoler kemik kaybını arttırdı.
- Morfometrik ölçüm sonuçlarına göre SR uygulanan tüm gruplarda alveoler kemik kaybı azalırken, SR900 grubunda anlamlı azalma gözlemlendi.
- Histopatolojik değerlendirmelere göre ligatür grubunda osteoklast sayısı artarken SR uygulanan gruplarda osteoklast sayılarında azalma gözlemlendi. Bu azalma kontrol grubundaki osteoklast sayıları ile benzerdi.
- SR300 dışında ligatür uygulanan tüm gruplarda osteoblast sayısında kontrol grubuna göre önemli artış saptandı.
- İmmünohistokimyasal analizler sonucunda SR900 grubunda RANKL aktivitesi yoğunluğu kontrol grubu ile benzerdi.
- ELİZA sonuçlarına göre SR'nin serum IL-1 β , OPG ve BALP düzeylerine herhangi bir önemli etkisi saptanmadı.
- Çalışmamızda SR uygulamalarıyla azalan RANKL aktivitesine bağlı olarak osteoklast sayılarında önemli düşüşle, özellikle SR900 grubunda alveoler kemik yıkımında azalma görüldü. Bununla birlikte SR'nin periodontitis tedavisinde kullanılabilmesi için farklı doz ve sürelerdeki etkinliğini araştıran ileriki çalışmalara gereksinim vardır.

7. KAYNAKLAR

- [1] Berglundh, T. and Donati, M. (2005). Aspects of adaptive host response in periodontitis. *J Clin Periodontol*, 32 Suppl 6 p. 87-107.
- [2] Greenstein, G. and Caton, J. (1990). Periodontal disease activity: a critical assessment. *J Periodontol*, 61(9): p. 543-52.
- [3] Goodson, J.M. (1992). Diagnosis of periodontitis by physical measurement: interpretation from episodic disease hypothesis. *J Periodontol*, 63(4 Suppl): p. 373-82.
- [4] Listgarten, M.A. (1988). The role of dental plaque in gingivitis and periodontitis. *J Clin Periodontol*, 15(8): p. 485-7.
- [5] Haffajee, A.D. and Socransky, S.S. (1994). Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000*, 5 p. 78-111.
- [6] Paster, B.J., Olsen, I., Aas, J.A., and Dewhirst, F.E. (2006). The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol 2000*, 42 p. 80-7.
- [7] Berezow, A.B. and Darveau, R.P. (2011). Microbial shift and periodontitis. *Periodontol 2000*, 55(1): p. 36-47.
- [8] Kinane, D.F. (2001). Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000*, 25 p. 8-20.
- [9] Cochran, D.L. (2008). Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J Periodontol*, 79(8 Suppl): p. 1569-76.
- [10] Nakashima, T., Kobayashi, Y., Yamasaki, S., Kawakami, A., Eguchi, K., Sasaki, H., and Sakai, H. (2000). Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun*, 275(3): p. 768-75.
- [11] Meng, H.X. (2007). [Association between periodontitis and diabetes mellitus]. *Beijing Da Xue Xue Bao*, 39(1): p. 18-20.
- [12] Zini, A., Sgan-Cohen, H.D., and Marcenes, W. (2011). Socio-economic position, smoking, and plaque: a pathway to severe chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*, 38(3): p. 229-35.
- [13] Rees, T.D. and Levine, R.A. (1995). Systemic drugs as a risk factor for periodontal disease initiation and progression. *Compendium*, 16(1): p. 20, 22, 26 passim; quiz 42.
- [14] Dolic, M., Bailer, J., Staehle, H.J., and Eickholz, P. (2005). Psychosocial factors as risk indicators of periodontitis. *J Clin Periodontol*, 32(11): p. 1134-40.
- [15] Suvan, J., D'Aiuto, F., Moles, D.R., Petrie, A., and Donos, N. (2011). Association between overweight/obesity and periodontitis in adults. A systematic review. *Obes Rev*, 12(5): p. e381-404.
- [16] Kinane, D.F. and Lowe, G.D. (2000). How periodontal disease may contribute to cardiovascular disease. *Periodontol 2000*, 23 p. 121-6.
- [17] Jeffcoat, M. (2005). The association between osteoporosis and oral bone loss. *J Periodontol*, 76(11 Suppl): p. 2125-32.
- [18] Genco, R.J. and Loe, H. (1993). The role of systemic conditions and disorders in periodontal disease. *Periodontol 2000*, 2 p. 98-116.

- [19] Page, R.C. (1991). The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res*, 26(3 Pt 2): p. 230-42.
- [20] Lopez-Marcos, J.F., Garcia-Valle, S., and Garcia-Iglesias, A.A. (2005). Periodontal aspects in menopausal women undergoing hormone replacement therapy. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 10(2): p. 132-41.
- [21] Agueda, A., Ramon, J.M., Manau, C., Guerrero, A., and Echeverria, J.J. (2008). Periodontal disease as a risk factor for adverse pregnancy outcomes: a prospective cohort study. *J Clin Periodontol*, 35(1): p. 16-22.
- [22] Dinarello, C.A. (1996). Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*, 87(6): p. 2095-147.
- [23] Matsuki, Y., Yamamoto, T., and Hara, K. (1991). Interleukin-1 mRNA-expressing macrophages in human chronically inflamed gingival tissues. *Am J Pathol*, 138(6): p. 1299-305.
- [24] Honig, J., Rordorf-Adam, C., Siegmund, C., Wiedemann, W., and Erard, F. (1989). Increased interleukin-1 beta (IL-1 beta) concentration in gingival tissue from periodontitis patients. *J Periodontal Res*, 24(6): p. 362-7.
- [25] Goes, P., Melo, I.M., Dutra, C.S., Lima, A.P., and Lima, V. (2012). Effect of alendronate on bone-specific alkaline phosphatase on periodontal bone loss in rats. *Arch Oral Biol*, 57(11): p. 1537-44.
- [26] Simonet, W.S., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., Kelley, M., Chang, M.S., Luthy, R., Nguyen, H.Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., Shimamoto, G., DeRose, M., Elliott, R., Colombero, A., Tan, H.L., Trail, G., Sullivan, J., Davy, E., Bucay, N., Renshaw-Gegg, L., Hughes, T.M., Hill, D., Pattison, W., Campbell, P., Sander, S., Van, G., Tarpley, J., Derby, P., Lee, R., and Boyle, W.J. (1997). Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 89(2): p. 309-19.
- [27] Tsuda, E., Goto, M., Mochizuki, S., Yano, K., Kobayashi, F., Morinaga, T., and Higashio, K. (1997). Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 234(1): p. 137-42.
- [28] Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinosaki, M., Mochizuki, S., Tomoyasu, A., Yano, K., Goto, M., Murakami, A., Tsuda, E., Morinaga, T., Higashio, K., Udagawa, N., Takahashi, N., and Suda, T. (1998). Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(7): p. 3597-602.
- [29] Hofbauer, L.C., Neubauer, A., and Heufelder, A.E. (2001). Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin: potential implications for the pathogenesis and treatment of malignant bone diseases. *Cancer*, 92(3): p. 460-70.
- [30] Reginster, J.Y., Deroisy, R., and Jupsin, I. (2003). Strontium ranelate: a new paradigm in the treatment of osteoporosis. *Drugs Today (Barc)*, 39(2): p. 89-101.
- [31] Canalis, E., Hott, M., Deloffre, P., Tsouderos, Y., and Marie, P.J. (1996). The divalent strontium salt S12911 enhances bone cell replication and bone formation in vitro. *Bone*, 18(6): p. 517-23.
- [32] Kanis, J.A., Johansson, H., Oden, A., and McCloskey, E.V. (2011). A meta-analysis of the effect of strontium ranelate on the risk of vertebral and non-vertebral fracture in postmenopausal osteoporosis and the interaction with FRAX((R)). *Osteoporos Int*, 22(8): p. 2347-55.

- [33] Reginster, J.Y., Deroisy, R., Dougados, M., Jupsin, I., Colette, J., and Roux, C. (2002). Prevention of early postmenopausal bone loss by strontium ranelate: the randomized, two-year, double-masked, dose-ranging, placebo-controlled PREVOS trial. *Osteoporos Int*, 13(12): p. 925-31.
- [34] Buehler, J., Chappuis, P., Saffar, J.L., Tsouderos, Y., and Vignery, A. (2001). Strontium ranelate inhibits bone resorption while maintaining bone formation in alveolar bone in monkeys (*Macaca fascicularis*). *Bone*, 29(2): p. 176-9.
- [35] Nanci, A. and Bosshardt, D.D. (2006). Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontol 2000*, 40 p. 11-28.
- [36] Socransky, S.S. (1970). Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. *J Dent Res*, 49(2): p. 203-22.
- [37] Armitage, G.C. (1999). Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*, 4(1): p. 1-6.
- [38] Flemmig, T.F. (1999). Periodontitis. *Ann Periodontol*, 4(1): p. 32-8.
- [39] (1999). The pathogenesis of periodontal diseases. *J Periodontol*, 70(4): p. 457-70.
- [40] Williams, R.C. (1990). Periodontal disease. *N Engl J Med*, 322(6): p. 373-82.
- [41] Darveau, R.P., Tanner, A., and Page, R.C. (1997). The microbial challenge in periodontitis. *Periodontol 2000*, 14 p. 12-32.
- [42] Gemmell, E., Marshall, R.I., and Seymour, G.J. (1997). Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontol 2000*, 14 p. 112-43.
- [43] Kornman, K.S., Page, R.C., and Tonetti, M.S. (1997). The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol 2000*, 14 p. 33-53.
- [44] Reynolds, J.J. and Meikle, M.C. (1997). Mechanisms of connective tissue matrix destruction in periodontitis. *Periodontol 2000*, 14 p. 144-57.
- [45] Graves, D.T. and Cochran, D. (2003). The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol*, 74(3): p. 391-401.
- [46] Page, R.C. and Kornman, K.S. (1997). The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000*, 14 p. 9-11.
- [47] Ozmeric, N. (2004). Advances in periodontal disease markers. *Clin Chim Acta*, 343(1-2): p. 1-16.
- [48] Battino, M., Bullon, P., Wilson, M., and Newman, H. (1999). Oxidative injury and inflammatory periodontal diseases: the challenge of anti-oxidants to free radicals and reactive oxygen species. *Crit Rev Oral Biol Med*, 10(4): p. 458-76.
- [49] Van der Weijden, G.A., Timmerman, M.F., Danser, M.M., Nijboer, A., Saxton, C.A., and Van der Velden, U. (1994). Effect of pre-experimental maintenance care duration on the development of gingivitis in a partial mouth experimental gingivitis model. *J Periodontol Res*, 29(3): p. 168-73.
- [50] Zambon, J.J. (1996). Periodontal diseases: microbial factors. *Ann Periodontol*, 1(1): p. 879-925.
- [51] Haffajee, A.D., Dzink, J.L., and Socransky, S.S. (1988). Effect of modified Widman flap surgery and systemic tetracycline on the subgingival microbiota of periodontal lesions. *J Clin Periodontol*, 15(4): p. 255-62.
- [52] van Winkelhoff, A.J., van der Velden, U., and de Graaff, J. (1988). Microbial succession in recolonizing deep periodontal pockets after a single course of supra- and subgingival debridement. *J Clin Periodontol*, 15(2): p. 116-22.

- [53] Dzink, J.L., Socransky, S.S., and Haffajee, A.D. (1988). The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. *J Clin Periodontol*, 15(5): p. 316-23.
- [54] Lai, C.H., Listgarten, M.A., Shirakawa, M., and Slots, J. (1987). *Bacteroides forsythus* in adult gingivitis and periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*, 2(4): p. 152-7.
- [55] Dzink, J.L., Socransky, S.S., Ebersole, J.L., and Frey, D.E. (1983). ELISA and conventional techniques for identification of black-pigmented *Bacteroides* isolated from periodontal pockets. *J Periodontal Res*, 18(4): p. 369-74.
- [56] Weinberg, M.A. and Bral, M. (1999). Laboratory animal models in periodontology. *J Clin Periodontol*, 26(6): p. 335-40.
- [57] Struillou, X., Boutigny, H., Soueidan, A., and Layrolle, P. (2010). Experimental animal models in periodontology: a review. *Open Dent J*, 4 p. 37-47.
- [58] de Lima, V., Bezerra, M.M., de Menezes Alencar, V.B., Vidal, F.D., da Rocha, F.A., de Castro Brito, G.A., and de Albuquerque Ribeiro, R. (2000). Effects of chlorpromazine on alveolar bone loss in experimental periodontal disease in rats. *Eur J Oral Sci*, 108(2): p. 123-9.
- [59] Gorustovich, A.A., Steimetz, T., Nielsen, F.H., and Guglielmotti, M.B. (2008). A histomorphometric study of alveolar bone modelling and remodelling in mice fed a boron-deficient diet. *Arch Oral Biol*, 53(7): p. 677-82.
- [60] Kuhr, A., Popa-Wagner, A., Schmoll, H., Schwahn, C., and Kocher, T. (2004). Observations on experimental marginal periodontitis in rats. *J Periodontal Res*, 39(2): p. 101-6.
- [61] Noronha, I.L., Niemir, Z., Stein, H., and Waldherr, R. (1995). Cytokines and growth factors in renal disease. *Nephrol Dial Transplant*, 10(6): p. 775-86.
- [62] Balkwill, F.R. and Burke, F. (1989). The cytokine network. *Immunol Today*, 10(9): p. 299-304.
- [63] Gaffen, S.L. and Hajishengallis, G. (2008). A new inflammatory cytokine on the block: re-thinking periodontal disease and the Th1/Th2 paradigm in the context of Th17 cells and IL-17. *J Dent Res*, 87(9): p. 817-28.
- [64] Dinarello, C.A. (2000). Proinflammatory cytokines. *Chest*, 118(2): p. 503-8.
- [65] Yavuzylmaz, E., Yamalik, N., Bulut, S., Ozen, S., Ersoy, F., and Saatci, U. (1995). The gingival crevicular fluid interleukin-1 beta and tumour necrosis factor-alpha levels in patients with rapidly progressive periodontitis. *Aust Dent J*, 40(1): p. 46-9.
- [66] Meikle, M.C., Heath, J.K., and Reynolds, J.J. (1986). Advances in understanding cell interactions in tissue resorption. Relevance to the pathogenesis of periodontal diseases and a new hypothesis. *J Oral Pathol*, 15(5): p. 239-50.
- [67] Dewhirst, F.E., Stashenko, P.P., Mole, J.E., and Tsurumachi, T. (1985). Purification and partial sequence of human osteoclast-activating factor: identity with interleukin 1 beta. *J Immunol*, 135(4): p. 2562-8.
- [68] Faizuddin, M., Bharathi, S.H., and Rohini, N.V. (2003). Estimation of interleukin-1beta levels in the gingival crevicular fluid in health and in inflammatory periodontal disease. *J Periodontal Res*, 38(2): p. 111-4.
- [69] Dinarello, C.A. (2006). Interleukin 1 and interleukin 18 as mediators of inflammation and the aging process. *Am J Clin Nutr*, 83(2): p. 447S-455S.
- [70] Thornberry, N.A., Bull, H.G., Calaycay, J.R., Chapman, K.T., Howard, A.D., Kostura, M.J., Miller, D.K., Molineaux, S.M., Weidner, J.R., Aunins, J., and et

- al. (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature*, 356(6372): p. 768-74.
- [71] Martinon, F., Burns, K., and Tschopp, J. (2002). The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell*, 10(2): p. 417-26.
- [72] Tokoro, Y., Yamamoto, T., and Hara, K. (1996). IL-1 beta mRNA as the predominant inflammatory cytokine transcript: correlation with inflammatory cell infiltration into human gingiva. *J Oral Pathol Med*, 25(5): p. 225-31.
- [73] Stashenko, P., Dewhirst, F.E., Peros, W.J., Kent, R.L., and Ago, J.M. (1987). Synergistic interactions between interleukin 1, tumor necrosis factor, and lymphotoxin in bone resorption. *J Immunol*, 138(5): p. 1464-8.
- [74] Heasman, P.A., Collins, J.G., and Offenbacher, S. (1993). Changes in crevicular fluid levels of interleukin-1 beta, leukotriene B4, prostaglandin E2, thromboxane B2 and tumour necrosis factor alpha in experimental gingivitis in humans. *J Periodontal Res*, 28(4): p. 241-7.
- [75] Lee, H.J., Kang, I.K., Chung, C.P., and Choi, S.M. (1995). The subgingival microflora and gingival crevicular fluid cytokines in refractory periodontitis. *J Clin Periodontol*, 22(11): p. 885-90.
- [76] Matsuki, Y., Yamamoto, T., and Hara, K. (1993). Localization of interleukin-1 (IL-1) mRNA-expressing macrophages in human inflamed gingiva and IL-1 activity in gingival crevicular fluid. *J Periodontal Res*, 28(1): p. 35-42.
- [77] Kostenuik, P.J. and Shalhoub, V. (2001). Osteoprotegerin: a physiological and pharmacological inhibitor of bone resorption. *Curr Pharm Des*, 7(8): p. 613-35.
- [78] Boyce, B.F. and Xing, L. (2007). Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther*, 9 Suppl 1 p. S1.
- [79] Bucay, N., Sarosi, I., Dunstan, C.R., Morony, S., Tarpley, J., Capparelli, C., Scully, S., Tan, H.L., Xu, W., Lacey, D.L., Boyle, W.J., and Simonet, W.S. (1998). osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev*, 12(9): p. 1260-8.
- [80] Bostanci, N., Ilgenli, T., Emingil, G., Afacan, B., Han, B., Toz, H., Atilla, G., Hughes, F.J., and Belibasakis, G.N. (2007). Gingival crevicular fluid levels of RANKL and OPG in periodontal diseases: implications of their relative ratio. *J Clin Periodontol*, 34(5): p. 370-6.
- [81] Wara-aswapati, N., Surarit, R., Chayasadam, A., Boch, J.A., and Pitiphat, W. (2007). RANKL upregulation associated with periodontitis and *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol*, 78(6): p. 1062-9.
- [82] Lacey, D.L., Timms, E., Tan, H.L., Kelley, M.J., Dunstan, C.R., Burgess, T., Elliott, R., Colombero, A., Elliott, G., Scully, S., Hsu, H., Sullivan, J., Hawkins, N., Davy, E., Capparelli, C., Eli, A., Qian, Y.X., Kaufman, S., Sarosi, I., Shalhoub, V., Senaldi, G., Guo, J., Delaney, J., and Boyle, W.J. (1998). Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*, 93(2): p. 165-76.
- [83] Voskaridou, E. and Terpos, E. (2005). Osteoprotegerin to soluble receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand ratio is reduced in patients with thalassaemia-related osteoporosis who receive vitamin D3. *Eur J Haematol*, 74(4): p. 359-61.
- [84] Lerner, U.H. (2006). Inflammation-induced bone remodeling in periodontal disease and the influence of post-menopausal osteoporosis. *J Dent Res*, 85(7): p. 596-607.

- [85] Kawai, T., Matsuyama, T., Hosokawa, Y., Makihira, S., Seki, M., Karimbux, N.Y., Goncalves, R.B., Valverde, P., Dibart, S., Li, Y.P., Miranda, L.A., Ernst, C.W., Izumi, Y., and Taubman, M.A. (2006). B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *Am J Pathol*, 169(3): p. 987-98.
- [86] Mogi, M., Ootogoto, J., Ota, N., and Togari, A. (2004). Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *J Dent Res*, 83(2): p. 166-9.
- [87] Kurban, S. ve Mehmetoğlu, İ. (2007). Osteoprotegerin, Rank ve Rank Ligandı. *Türk Biyokimya Dergisi*, 32(4): p. 178-184.
- [88] Babür, C. ve Özcan, G. (2010). OPG/RANK/RANKL'in Periodontolojideki Yeri. *Gazi Üniversitesi Diş. Hek. Fak. Dergisi*, 27(2): p. 137-144.
- [89] Whyte, M.P. (2010). Physiological role of alkaline phosphatase explored in hypophosphatasia. *Ann N Y Acad Sci*, 1192 p. 190-200.
- [90] Pagani, F., Francucci, C.M., and Moro, L. (2005). Markers of bone turnover: biochemical and clinical perspectives. *J Endocrinol Invest*, 28(10 Suppl): p. 8-13.
- [91] Du, Z., Chen, J., Yan, F., Doan, N., Ivanovski, S., and Xiao, Y. (2013). Serum bone formation marker correlation with improved osseointegration in osteoporotic rats treated with simvastatin. *Clin Oral Implants Res*, 24(4): p. 422-7.
- [92] Sparidans, R.W., Twiss, I.M., and Talbot, S. (1998). Bisphosphonates in bone diseases. *Pharm World Sci*, 20(5): p. 206-13.
- [93] Madrid, C. and Sanz, M. (2009). What impact do systemically administrated bisphosphonates have on oral implant therapy? A systematic review. *Clin Oral Implants Res*, 20 Suppl 4 p. 87-95.
- [94] Russell, R.G. (2006). Bisphosphonates: from bench to bedside. *Ann N Y Acad Sci*, 1068 p. 367-401.
- [95] Kavanagh, K.L., Guo, K., Dunford, J.E., Wu, X., Knapp, S., Ebetino, F.H., Rogers, M.J., Russell, R.G., and Oppermann, U. (2006). The molecular mechanism of nitrogen-containing bisphosphonates as antiosteoporosis drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(20): p. 7829-34.
- [96] Reszka, A.A. and Rodan, G.A. (2003). Mechanism of action of bisphosphonates. *Curr Osteoporos Rep*, 1(2): p. 45-52.
- [97] Gomez Font, R., Martinez Garcia, M.L., and Olmos Martinez, J.M. (2008). Osteochemonecrosis of the jaws due to bisphosphonate treatments. Update. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 13(5): p. E318-24.
- [98] Murakami, H., Takahashi, N., Sasaki, T., Udagawa, N., Tanaka, S., Nakamura, I., Zhang, D., Barbier, A., and Suda, T. (1995). A possible mechanism of the specific action of bisphosphonates on osteoclasts: tiludronate preferentially affects polarized osteoclasts having ruffled borders. *Bone*, 17(2): p. 137-44.
- [99] Goziotis, A., Sukhu, B., Torontali, M., Dowhaniuk, M., and Tenenbaum, H.C. (1995). Effects of bisphosphonates APD and HEBP on bone metabolism in vitro. *Bone*, 16(4 Suppl): p. 317S-327S.
- [100] Tenenbaum, H.C., Torontali, M., and Sukhu, B. (1992). Effects of bisphosphonates and inorganic pyrophosphate on osteogenesis in vitro. *Bone*, 13(3): p. 249-55.
- [101] Giuliani, N., Pedrazzoni, M., Negri, G., Passeri, G., Impicciatore, M., and Girasole, G. (1998). Bisphosphonates stimulate formation of osteoblast precursors and mineralized nodules in murine and human bone marrow cultures

- in vitro and promote early osteoblastogenesis in young and aged mice in vivo. *Bone*, 22(5): p. 455-61.
- [102] Vitte, C., Fleisch, H., and Guenther, H.L. (1996). Bisphosphonates induce osteoblasts to secrete an inhibitor of osteoclast-mediated resorption. *Endocrinology*, 137(6): p. 2324-33.
- [103] El-Shinnawi, U.M. and El-Tantawy, S.I. (2003). The effect of alendronate sodium on alveolar bone loss in periodontitis (clinical trial). *J Int Acad Periodontol*, 5(1): p. 5-10.
- [104] Menezes, A.M., Rocha, F.A., Chaves, H.V., Carvalho, C.B., Ribeiro, R.A., and Brito, G.A. (2005). Effect of sodium alendronate on alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol*, 76(11): p. 1901-9.
- [105] Bragger, U., Pasquali, L., and Kornman, K.S. (1988). Remodelling of interdental alveolar bone after periodontal flap procedures assessed by means of computer-assisted densitometric image analysis (CADIA). *J Clin Periodontol*, 15(9): p. 558-64.
- [106] Yaffe, A., Fine, N., Alt, I., and Binderman, I. (1995). The effect of bisphosphonate on alveolar bone resorption following mucoperiosteal flap surgery in the mandible of rats. *J Periodontol*, 66(11): p. 999-1003.
- [107] Yaffe, A., Iztovich, M., Earon, Y., Alt, I., Lilov, R., and Binderman, I. (1997). Local delivery of an amino bisphosphonate prevents the resorptive phase of alveolar bone following mucoperiosteal flap surgery in rats. *J Periodontol*, 68(9): p. 884-9.
- [108] Soileau, K.M. (2006). Oral post-surgical complications following the administration of bisphosphonates given for osteopenia related to malignancy. *J Periodontol*, 77(4): p. 738-43.
- [109] Wang, H.L., Weber, D., and McCauley, L.K. (2007). Effect of long-term oral bisphosphonates on implant wound healing: literature review and a case report. *J Periodontol*, 78(3): p. 584-94.
- [110] Deng, X., Tamai, R., Endo, Y., and Kiyoura, Y. (2009). Alendronate augments interleukin-1beta release from macrophages infected with periodontal pathogenic bacteria through activation of caspase-1. *Toxicol Appl Pharmacol*, 235(1): p. 97-104.
- [111] Duarte, P.M., de Assis, D.R., Casati, M.Z., Sallum, A.W., Sallum, E.A., and Nociti, F.H., Jr. (2004). Alendronate may protect against increased periodontitis-related bone loss in estrogen-deficient rats. *J Periodontol*, 75(9): p. 1196-202.
- [112] Buduneli, E., Vardar, S., Buduneli, N., Berdeli, A.H., Turkoglu, O., Baskesen, A., and Atilla, G. (2004). Effects of combined systemic administration of low-dose doxycycline and alendronate on endotoxin-induced periodontitis in rats. *J Periodontol*, 75(11): p. 1516-23.
- [113] Price, U., Le, H.O., Powell, S.E., Schmid, M.J., Marx, D.B., Zhang, Y., Wang, D., Narayana, N., and Reinhardt, R.A. (2013). Effects of local simvastatin-alendronate conjugate in preventing periodontitis bone loss. *J Periodontol Res*, 48(5): p. 541-8.
- [114] Sharma, A. and Pradeep, A.R. (2012). Clinical efficacy of 1% alendronate gel as a local drug delivery system in the treatment of chronic periodontitis: a randomized, controlled clinical trial. *J Periodontol*, 83(1): p. 11-8.
- [115] Wu, Y., Adeeb, S.M., Duke, M.J., Munoz-Paniagua, D., and Doschak, M.R. (2013). Compositional and material properties of rat bone after bisphosphonate and/or Strontium ranelate drug treatment. *J Pharm Pharm Sci*, 16(1): p. 52-64.

- [116] Kutsal, Y.G., Atalay, A., Arslan, S., Basaran, A., Canturk, F., Cindas, A., Eryavuz, M., Irdesel, J., Karadavut, K.I., Kirazli, Y., Sindel, D., Senel, K., Guler-Uysal, F., and Yildirim, K. (2005). Awareness of osteoporotic patients. *Osteoporos Int*, 16(2): p. 128-33.
- [117] Takaoka, S., Yamaguchi, T., Yano, S., Yamauchi, M., and Sugimoto, T. (2010). The Calcium-sensing Receptor (CaR) is involved in strontium ranelate-induced osteoblast differentiation and mineralization. *Horm Metab Res*, 42(9): p. 627-31.
- [118] Caverzasio, J. (2008). Strontium ranelate promotes osteoblastic cell replication through at least two different mechanisms. *Bone*, 42(6): p. 1131-6.
- [119] Brennan, T.C., Rybchyn, M.S., Green, W., Atwa, S., Conigrave, A.D., and Mason, R.S. (2009). Osteoblasts play key roles in the mechanisms of action of strontium ranelate. *Br J Pharmacol*, 157(7): p. 1291-300.
- [120] Chattopadhyay, N., Quinn, S.J., Kifor, O., Ye, C., and Brown, E.M. (2007). The calcium-sensing receptor (CaR) is involved in strontium ranelate-induced osteoblast proliferation. *Biochem Pharmacol*, 74(3): p. 438-47.
- [121] Chen, B., Li, Y., Yang, X., and Xie, D. (2013). Comparable effects of alendronate and strontium ranelate on femur in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int*, 93(5): p. 481-6.
- [122] Atkins, G.J., Welldon, K.J., Halbout, P., and Findlay, D.M. (2009). Strontium ranelate treatment of human primary osteoblasts promotes an osteocyte-like phenotype while eliciting an osteoprotegerin response. *Osteoporos Int*, 20(4): p. 653-64.
- [123] Ammann, P., Shen, V., Robin, B., Mauras, Y., Bonjour, J.P., and Rizzoli, R. (2004). Strontium ranelate improves bone resistance by increasing bone mass and improving architecture in intact female rats. *J Bone Miner Res*, 19(12): p. 2012-20.
- [124] Ammann, P. (2006). Strontium ranelate: a physiological approach for an improved bone quality. *Bone*, 38(2 Suppl 1): p. 15-8.
- [125] Choudhary, S., Halbout, P., Alander, C., Raisz, L., and Pilbeam, C. (2007). Strontium ranelate promotes osteoblastic differentiation and mineralization of murine bone marrow stromal cells: involvement of prostaglandins. *J Bone Miner Res*, 22(7): p. 1002-10.
- [126] Fernandez, J.M., Molinuevo, M.S., McCarthy, A.D., and Cortizo, A.M. (2014). Strontium ranelate stimulates the activity of bone-specific alkaline phosphatase: interaction with Zn(2+) and Mg (2+). *Biometals*, 27(3): p. 601-7.
- [127] Kirschneck, C., Wolf, M., Reicheneder, C., Wahlmann, U., Proff, P., and Roemer, P. (2014). Strontium ranelate improved tooth anchorage and reduced root resorption in orthodontic treatment of rats. *Eur J Pharmacol*, 744 p. 67-75.
- [128] Zhao, S., Wang, X., Li, N., Chen, Y., Su, Y., and Zhang, J. (2015). Effects of strontium ranelate on bone formation in the mid-palatal suture after rapid maxillary expansion. *Drug Des Devel Ther*, 9 p. 2725-34.
- [129] Romer, P., Desaga, B., Proff, P., Faltermeier, A., and Reicheneder, C. (2012). Strontium promotes cell proliferation and suppresses IL-6 expression in human PDL cells. *Ann Anat*, 194(2): p. 208-11.
- [130] Tenti, S., Chelleschi, S., Guidelli, G.M., Galeazzi, M., and Fioravanti, A. (2014). What about strontium ranelate in osteoarthritis? Doubts and securities. *Mod Rheumatol*, 24(6): p. 881-4.
- [131] de Melo Nunes, R., Martins, M.R., da Silva Junior, F.S., de Melo Leite, A.C., Girao, V.C., de Queiroz Cunha, F., Marinho, A.L., Pinto, A.C., and Rocha, F.A.

- (2015). Strontium ranelate analgesia in arthritis models is associated to decreased cytokine release and opioid-dependent mechanisms. *Inflamm Res*, 64(10): p. 781-7.
- [132] Liu, X., Zhu, S., Cui, J., Shao, H., Zhang, W., Yang, H., Xu, Y., Geng, D., and Yu, L. (2014). Strontium ranelate inhibits titanium-particle-induced osteolysis by restraining inflammatory osteoclastogenesis in vivo. *Acta Biomater*, 10(11): p. 4912-8.
- [133] Fromigue, O., Hay, E., Barbara, A., Petrel, C., Traiffort, E., Ruat, M., and Marie, P.J. (2009). Calcium sensing receptor-dependent and receptor-independent activation of osteoblast replication and survival by strontium ranelate. *J Cell Mol Med*, 13(8B): p. 2189-99.
- [134] Reginster, J.Y., Felsenberg, D., Boonen, S., Diez-Perez, A., Rizzoli, R., Brandi, M.L., Spector, T.D., Brixen, K., Goemaere, S., Cormier, C., Balogh, A., Delmas, P.D., and Meunier, P.J. (2008). Effects of long-term strontium ranelate treatment on the risk of nonvertebral and vertebral fractures in postmenopausal osteoporosis: Results of a five-year, randomized, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum*, 58(6): p. 1687-95.
- [135] Stevenson, M., Davis, S., Lloyd-Jones, M., and Beverley, C. (2007). The clinical effectiveness and cost-effectiveness of strontium ranelate for the prevention of osteoporotic fragility fractures in postmenopausal women. *Health Technol Assess*, 11(4): p. 1-134.
- [136] Kramkimel, N., Sibon, C., Le Beller, C., Saiag, P., and Mahe, E. (2009). Bullous DRESS in a patient on strontium ranelate. *Clin Exp Dermatol*, 34(7): p. e349-50.
- [137] Yang, C.Y., Chen, C.H., Wang, H.Y., Hsiao, H.L., Hsiao, Y.H., and Chung, W.H. (2014). Strontium ranelate related Stevens-Johnson syndrome: a case report. *Osteoporos Int*, 25(6): p. 1813-6.
- [138] Pernicova, I., Middleton, E.T., and Aye, M. (2008). Rash, strontium ranelate and DRESS syndrome put into perspective. European Medicine Agency on the alert. *Osteoporos Int*, 19(12): p. 1811-2.
- [139] Abrahamsen, B., Grove, E.L., and Vestergaard, P. (2014). Nationwide registry-based analysis of cardiovascular risk factors and adverse outcomes in patients treated with strontium ranelate. *Osteoporos Int*, 25(2): p. 757-62.
- [140] Svanstrom, H., Pasternak, B., and Hviid, A. (2014). Use of strontium ranelate and risk of acute coronary syndrome: cohort study. *Ann Rheum Dis*, 73(6): p. 1037-43.
- [141] Cooper, C., Fox, K.M., and Borer, J.S. (2014). Ischaemic cardiac events and use of strontium ranelate in postmenopausal osteoporosis: a nested case-control study in the CPRD. *Osteoporos Int*, 25(2): p. 737-45.
- [142] Vestergaard, P. (2014). New strategies for osteoporosis patients previously managed with strontium ranelate. *Ther Adv Musculoskelet Dis*, 6(6): p. 217-25.
- [143] Atteritano, M., Catalano, A., Santoro, D., Lasco, A., and Benvenga, S. (2015). Effects of strontium ranelate on markers of cardiovascular risk in postmenopausal osteoporotic women. *Endocrine*.
- [144] Demirer, S., Kara, M.I., Erciyas, K., Ozdemir, H., Ozer, H., and Ay, S. (2012). Effects of boric acid on experimental periodontitis and alveolar bone loss in rats. *Arch Oral Biol*, 57(1): p. 60-5.
- [145] Balci Yuce, H., Toker, H., and Goze, F. (2014). The histopathological and morphometric investigation of the effects of systemically administered boric

- acid on alveolar bone loss in ligature-induced periodontitis in diabetic rats. *Acta Odontol Scand*, 72(8): p. 729-36.
- [146] Page, R.C., Offenbacher, S., Schroeder, H.E., Seymour, G.J., and Kornman, K.S. (1997). Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol 2000*, 14 p. 216-48.
- [147] Zhang, Z., Zheng, Y., and Bian, X. (2015). Clinical effect of azithromycin as an adjunct to non-surgical treatment of chronic periodontitis: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *J Periodontal Res*.
- [148] Priyanka, N., Kalra, N., Saquib, S., Kudiyar, N., Malgaonkar, N., Jain, H., and Pradeep, A.R. (2015). Clinical and microbiological efficacy of 3% satranidazole gel as a local drug delivery system in the treatment of chronic periodontitis: A randomized, controlled clinical trial. *Contemp Clin Dent*, 6(3): p. 364-70.
- [149] Sharma, A. and Pradeep, A.R. (2012). Clinical efficacy of 1% alendronate gel in adjunct to mechanotherapy in the treatment of aggressive periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *J Periodontol*, 83(1): p. 19-26.
- [150] Goes, P., Melo, I.M., Silva, L.M., Benevides, N.M., Alencar, N.M., Ribeiro, R.A., and Lima, V. (2014). Low-dose combination of alendronate and atorvastatin reduces ligature-induced alveolar bone loss in rats. *J Periodontal Res*, 49(1): p. 45-54.
- [151] Toker, H., Ozan, F., Ozer, H., Ozdemir, H., Eren, K., and Yeler, H. (2008). A morphometric and histopathologic evaluation of the effects of propolis on alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol*, 79(6): p. 1089-94.
- [152] Saglam, M., Koseoglu, S., Hatipoglu, M., Esen, H.H., and Koksall, E. (2015). Effect of sumac extract on serum oxidative status, RANKL/OPG system and alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J Appl Oral Sci*, 23(1): p. 33-41.
- [153] Saglam, M., Hatipoglu, M., Koseoglu, S., Esen, H.H., and Kelebek, S. (2014). Boric acid inhibits alveolar bone loss in rats by affecting RANKL and osteoprotegerin expression. *J Periodontal Res*, 49(4): p. 472-9.
- [154] Di Paola, R., Mazzon, E., Zito, D., Maiere, D., Britti, D., Genovese, T., and Cuzzocrea, S. (2005). Effects of Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, in a rodent model periodontitis. *J Clin Periodontol*, 32(10): p. 1062-8.
- [155] Vignery, A. and Baron, R. (1980). Dynamic histomorphometry of alveolar bone remodeling in the adult rat. *Anat Rec*, 196(2): p. 191-200.
- [156] Amstad-Jossi, M. and Schroeder, H.E. (1978). Age-related alterations of periodontal structures around the cemento-enamel junction and of the gingival connective tissue composition in germ-free rats. *J Periodontal Res*, 13(1): p. 76-90.
- [157] Bain, S.D., Jerome, C., Shen, V., Dupin-Roger, I., and Ammann, P. (2009). Strontium ranelate improves bone strength in ovariectomized rat by positively influencing bone resistance determinants. *Osteoporos Int*, 20(8): p. 1417-28.
- [158] Bonnelye, E., Chabadel, A., Saltel, F., and Jurdic, P. (2008). Dual effect of strontium ranelate: stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro. *Bone*, 42(1): p. 129-38.
- [159] Marie, P.J., Hott, M., Modrowski, D., De Pollak, C., Guillemain, J., Deloffre, P., and Tsouderos, Y. (1993). An uncoupling agent containing strontium prevents

- bone loss by depressing bone resorption and maintaining bone formation in estrogen-deficient rats. *J Bone Miner Res*, 8(5): p. 607-15.
- [160] Ammann, P., Badoud, I., Barraud, S., Dayer, R., and Rizzoli, R. (2007). Strontium ranelate treatment improves trabecular and cortical intrinsic bone tissue quality, a determinant of bone strength. *J Bone Miner Res*, 22(9): p. 1419-25.
- [161] Ahmet-Camcioglu, N., Okman-Kilic, T., Durmus-Altun, G., Ekuklu, G., and Kucuk, M. (2009). Effects of strontium ranelate, raloxifene and misoprostol on bone mineral density in ovariectomized rats. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 147(2): p. 192-4.
- [162] Iwata, K., Li, J., Follet, H., Phipps, R.J., and Burr, D.B. (2006). Bisphosphonates suppress periosteal osteoblast activity independently of resorption in rat femur and tibia. *Bone*, 39(5): p. 1053-8.
- [163] Maimoun, L., Brennan, T.C., Badoud, I., Dubois-Ferriere, V., Rizzoli, R., and Ammann, P. (2010). Strontium ranelate improves implant osseointegration. *Bone*, 46(5): p. 1436-41.
- [164] Li, Y., Feng, G., Gao, Y., Luo, E., Liu, X., and Hu, J. (2010). Strontium ranelate treatment enhances hydroxyapatite-coated titanium screws fixation in osteoporotic rats. *J Orthop Res*, 28(5): p. 578-82.
- [165] Zacchetti, G., Dayer, R., Rizzoli, R., and Ammann, P. (2014). Systemic treatment with strontium ranelate accelerates the filling of a bone defect and improves the material level properties of the healing bone. *Biomed Res Int*, 2014 p. 549785.
- [166] Fuchs, R.K., Allen, M.R., Condon, K.W., Reinwald, S., Miller, L.M., McClenathan, D., Keck, B., Phipps, R.J., and Burr, D.B. (2008). Strontium ranelate does not stimulate bone formation in ovariectomized rats. *Osteoporos Int*, 19(9): p. 1331-41.
- [167] Linderback, P., Agholme, F., Wermelin, K., Narhi, T., Tengvall, P., and Aspenberg, P. (2012). Weak effect of strontium on early implant fixation in rat tibia. *Bone*, 50(1): p. 350-6.
- [168] Chen, B., Li, Y., Yang, X., Xu, H., and Xie, D. (2013). Zoledronic acid enhances bone-implant osseointegration more than alendronate and strontium ranelate in ovariectomized rats. *Osteoporos Int*, 24(7): p. 2115-21.
- [169] Ebersole, J.L. and Cappelli, D. (2000). Acute-phase reactants in infections and inflammatory diseases. *Periodontol 2000*, 23 p. 19-49.
- [170] McGee, J.M., Tucci, M.A., Edmundson, T.P., Serio, C.L., and Johnson, R.B. (1998). The relationship between concentrations of proinflammatory cytokines within gingiva and the adjacent sulcular depth. *J Periodontol*, 69(8): p. 865-71.
- [171] Stashenko, P., Fujiyoshi, P., Obernesser, M.S., Probst, L., Haffajee, A.D., and Socransky, S.S. (1991). Levels of interleukin 1 beta in tissue from sites of active periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 18(7): p. 548-54.
- [172] Ishihara, Y., Nishihara, T., Kuroyanagi, T., Shirozu, N., Yamagishi, E., Ohguchi, M., Koide, M., Ueda, N., Amano, K., and Noguchi, T. (1997). Gingival crevicular interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist levels in periodontally healthy and diseased sites. *J Periodontol Res*, 32(6): p. 524-9.
- [173] Buduneli, E., Buduneli, N., Vardar-Sengul, S., Kardesler, L., Atilla, G., Lappin, D., and Kinane, D.F. (2005). Systemic low-dose doxycycline and alendronate administration and serum interleukin-1beta, osteocalcin, and C-reactive protein levels in rats. *J Periodontol*, 76(11): p. 1927-33.

- [174] Ide, M., McPartlin, D., Coward, P.Y., Crook, M., Lumb, P., and Wilson, R.F. (2003). Effect of treatment of chronic periodontitis on levels of serum markers of acute-phase inflammatory and vascular responses. *J Clin Periodontol*, 30(4): p. 334-40.
- [175] Ide, M., Jagdev, D., Coward, P.Y., Crook, M., Barclay, G.R., and Wilson, R.F. (2004). The short-term effects of treatment of chronic periodontitis on circulating levels of endotoxin, C-reactive protein, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-6. *J Periodontol*, 75(3): p. 420-8.
- [176] Murata, M., Tatsumi, J., Kato, Y., Suda, S., Nunokawa, Y., Kobayashi, Y., Takeda, H., Araki, H., Shin, K., Okuda, K., Miyata, T., and Yoshie, H. (2002). Osteocalcin, deoxypyridinoline and interleukin-1beta in peri-implant crevicular fluid of patients with peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res*, 13(6): p. 637-43.
- [177] Gorska, R., Gregorek, H., Kowalski, J., Laskus-Perendyk, A., Syczewska, M., and Madalinski, K. (2003). Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*, 30(12): p. 1046-52.
- [178] Fernandez, J.M., Molinuevo, M.S., Sedlinsky, C., Schurman, L., Cortizo, A.M., and McCarthy, A.D. (2013). Strontium ranelate prevents the deleterious action of advanced glycation endproducts on osteoblastic cells via calcium channel activation. *Eur J Pharmacol*, 706(1-3): p. 41-7.
- [179] Boyle, W.J., Simonet, W.S., and Lacey, D.L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 423(6937): p. 337-42.
- [180] Burgess, T.L., Qian, Y., Kaufman, S., Ring, B.D., Van, G., Capparelli, C., Kelley, M., Hsu, H., Boyle, W.J., Dunstan, C.R., Hu, S., and Lacey, D.L. (1999). The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol*, 145(3): p. 527-38.
- [181] Schoppet, M., Preissner, K.T., and Hofbauer, L.C. (2002). RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22(4): p. 549-53.
- [182] Zhang, Y., Wei, L., Wu, C., and Miron, R.J. (2014). Periodontal regeneration using strontium-loaded mesoporous bioactive glass scaffolds in osteoporotic rats. *PLoS One*, 9(8): p. e104527.
- [183] Wu, C., Zhou, Y., Lin, C., Chang, J., and Xiao, Y. (2012). Strontium-containing mesoporous bioactive glass scaffolds with improved osteogenic/cementogenic differentiation of periodontal ligament cells for periodontal tissue engineering. *Acta Biomater*, 8(10): p. 3805-15.
- [184] Meunier, P.J., Slosman, D.O., Delmas, P.D., Sebert, J.L., Brandi, M.L., Albanese, C., Lorenc, R., Pors-Nielsen, S., De Vernejoul, M.C., Roces, A., and Reginster, J.Y. (2002). Strontium ranelate: dose-dependent effects in established postmenopausal vertebral osteoporosis--a 2-year randomized placebo controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab*, 87(5): p. 2060-6.
- [185] Meunier, P.J., Roux, C., Seeman, E., Ortolani, S., Badurski, J.E., Spector, T.D., Cannata, J., Balogh, A., Lemmel, E.M., Pors-Nielsen, S., Rizzoli, R., Genant, H.K., and Reginster, J.Y. (2004). The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med*, 350(5): p. 459-68.
- [186] Er, K., Polat, Z.A., Ozan, F., Tasdemir, T., Sezer, U., and Siso, S.H. (2008). Cytotoxicity analysis of strontium ranelate on cultured human periodontal ligament fibroblasts: a preliminary report. *J Formos Med Assoc*, 107(8): p. 609-15.

T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

Sayı : 65202830 /46
Konu : Etik Kurul Kararı.

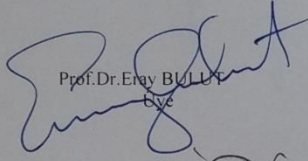
10.04.2014

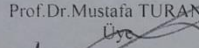
Sayın

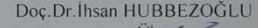
Yrd.Doç.Dr.Aysun AKPINAR
Diş Hekimliği
Periodontoloji

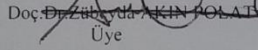
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 10.04.2014 tarihinde Prof.Dr.Haki KARA başkanlığında toplanarak aşağıdaki kararları almıştır.

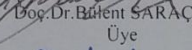
Yrd.Doç.Dr.Aysun AKPINAR'ın yürütücülüğünü yapmış olduğu 27.03.2014 tarih ve 29 sayılı "Ratlarda oluşturulan deneysel periodontitis modelinde sistemik olarak uygulanan stronsiyum ranelatin alveoler kemik rezorpsiyonu üzerindeki etkisinin histomorfometrik ve histopatolojik açıdan araştırılması" isimli Diş Hekimliğinde Uzmanlık Tezi Etik Kurulumuzca kabul edilmiştir."ın yürütücülüğünü yapmış olduğu 27.03.2014 tarih ve 29 sayılı "Ratlarda oluşturulan deneysel periodontitis modelinde sistemik olarak uygulanan stronsiyum ranelatin alveoler kemik rezorpsiyonu üzerindeki etkisinin histomorfometrik ve histopatolojik açıdan araştırılması" isimli Diş Hekimliğinde Uzmanlık Tezi Etik Kurulumuzca kabul edilmiştir.

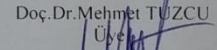

Prof.Dr.Eray BULDU
Üye

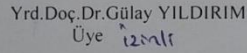

Prof.Dr.Mustafa TURAN
Üye

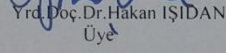

Doç.Dr.İhsan HUBBEZOĞLU
Üye

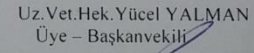

Doç.Dr.Zübeyde AKIN POLAT
Üye

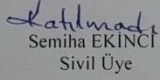

Doç.Dr.Bülent SARAÇ
Üye

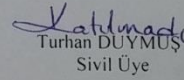

Doç.Dr.Mehmet TUŞCU
Üye

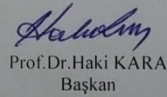

Yrd.Doç.Dr.Gülay YILDIRIM
Üye


Yrd.Doç.Dr.Hakan İŞİDAN
Üye


Uz.Vet.Hek.Yücel YALMAN
Üye – Başkanvekili


Katılmadı
Semiha EKİNCİ
Sivil Üye


Katılmadı
Turhan DUYMUŞ
Sivil Üye


Prof.Dr.Haki KARA
Başkan

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel bilgiler

| | |
|----------------------|--|
| Adı Soyadı | Nebi Cansın KARAKAN |
| Doğum Yeri ve Tarihi | Eskişehir-1986 |
| Medeni Hali | Bekar |
| Yabancı Dil | İngilizce |
| İletişim Adresi | Cumhuriyet Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Periodontoloji Anabilim Dalı, 58140-Sivas |
| E-posta Adresi | cansinkarakan@hotmail.com |

Eğitim ve Akademik Durumu

| | |
|----------------------|--|
| Lise | Eskişehir Özel Atayurt Fen Lisesi |
| Lisans/Yüksek Lisans | İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, 2010 |
| Uzmanlık | Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı, 2012- |

İş Deneyimi

| | |
|-------------------------|----------------------------|
| Sağlık Bakanlığı | Diş Hekimi, 2010-2011 |
| Cumhuriyet Üniversitesi | Araştırma Görevlisi, 2012- |