



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

**OSTEOPOROTİK RATLARDA OLUŞTURULAN DENEYSEL
PERİODONTİTİS MODELİNDE KEMİK REZORPSİYONU
ÜZERİNE SİSTEMİK OLARAK ALINAN MELATONİNİN
ETKİSİNİN HİSTOPATOLOJİK VE HİSTOMORFOMETRİK
AÇIDAN ARAŞTIRILMASI**

SUAT SERHAN ALTINTEPE DOĞAN

**DOKTORA TEZİ
PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI**

SİVAS-2015

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

**OSTEOPOROTİK RATLARDA OLUŞTURULAN DENEYSEL
PERİODONTİTİS MODELİNDE KEMİK REZORPSİYONU
ÜZERİNE SİSTEMİK OLARAK ALINAN MELATONİNİN
ETKİSİNİN HİSTOPATOLOJİK VE HİSTOMORFOMETRİK
AÇIDAN ARAŞTIRILMASI**

SUAT SERHAN ALTINTEPE DOĞAN


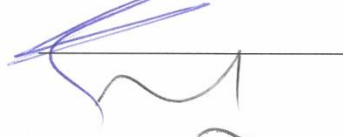
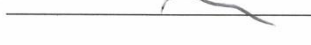


DOKTORA TEZİ

PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI

**TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. HÜLYA TOKER**

SİVAS-2015

Bu çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Periodontoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan	Prof. Dr. Kaya EREN	
Üye	Doç. Dr. Serhat DEMİRER	
Üye	Doç. Dr. H. Hüseyin KÖŞGER	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Aysun AKPINAR	
Üye (Danışman)	Doç. Dr. Hülya TOKER	

ONAY

Bu tez çalışması, 02.04.2015 tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ali ÇELİKSÖZ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

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

ÖZET

OSTEOPOROTİK RATLARDA OLUŞTURULAN DENEYSEL PERİODONTİTİS MODELİNDE KEMİK REZORPSİYONU ÜZERİNE SİSTEMİK OLARAK ALINAN MELATONİNİN ETKİSİNİN HİSTOPATOLOJİK VE HİSTOMORFOMETRİK AÇIDAN ARAŞTIRILMASI

Suat Serhan ALTINTEPE DOĞAN

Doktora Tezi

Periodontoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Hülya TOKER

2015, 72sayfa

Bu çalışmanın amacı, osteoporotik ratlarda oluşturulan deneysel periodontitis modelinde alveoler kemik rezorpsiyonu üzerine sistemik olarak verilen melatoninin etkisinin histopatolojik ve histomorfometrik açıdan araştırılmasıdır.

44 Wistar rat rastgele 6 deney grubuna ayrıldı: kontrol (K, n=6) grubu; osteoporoz (O, n=6) grubu; ligatürlü periodontitis (LP, n=8) grubu; osteoporoz ve periodontitis (O+LP, n=8) grubu; osteoporozlu, periodontitis ve 30 mg/kg/gün melatonin (ML30, n=8) grubu; osteoporozlu, periodontitis ve 50 mg/kg/gün melatonin (ML50, n=8) grubu. Osteoporoz oluşturmak için ratların overleri bilateral olarak alındı ve 4 ay bekletildi. 4. ayın sonunda deneysel periodontitisi indüklemek için her ratın mandibular birinci molarının çevresine 4/0 ipek ligatürler submarginal olarak yerleştirildi. 30 gün melatonin uygulaması sonrasında ratlar sakrifiye edildi. Alveol kemik kaybı stereomikroskopta mine-sement sınırı ile alveol kret tepesi arasındaki mesafe olarak ölçüldü. Serum IL-6 seviyesi ELİZA ile belirlendi. Histopatolojik olarak enflamatuvar hücre infiltrasyonu, osteoklast ve osteoblast sayıları ile immünohistokimyasal olarak nükleer faktör kappa B'nin reseptör aktivatör bağlayıcısı (RANKL) aktivitesi değerlendirildi.

Çalışma sonuçlarına göre, LP ve O+LP gruplarındaki alveoler kemik kaybı ve enflamatuvar hücre infiltratı diğer gruplara oranla anlamlı düzeyde yüksekti ($p<0.05$). Ayrıca K, O ve ML30 gruplarında alveoler kemik kaybı benzerdi. En yüksek osteoklast sayısı O+LP grubunda saptandı ($p<0.05$) ve ML30, ML50, K ve O grupları arasında

anlamli bir farklılık gözlenmedi ($p>0.05$). En düşük osteoblast sayısı K grubunda gözlenirken, en yüksek ML30 ve ML50 gruplarında tespit edildi. O+LP grubunda RANKL aktivitesi artış gösterirken, melatonin uygulaması RANKL aktivitesini anlamli oranda azalttı. Gruplara ait IL-6 değerleri karşılaştırıldığında anlamli bir farklılık bulunmadı.

Bu çalışmanın sınırları dahilinde; periodontitisli osteoporotik rat modelinde sistemik olarak verilen melatoninin RANKL aktivitesinde azalma, osteoblastik aktivitede artış yoluyla alveoler kemik kaybını önlediği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Deneysel osteoporoz, deneysel periodontitis, alveoler kemik kaybı, melatonin

ABSTRACT

THE HISTOPATHOLOGICAL AND HISTOMORPHOMETRIC INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF SYSTEMICALLY ADMINISTERED MELATONIN ON BONE RESORPTION IN EXPERIMENTAL PERIODONTITIS MODEL IN OSTEOPOROTIC RATS.

Suat Serhan ALTINTEPE DOĞAN

Ph.D. Thesis

Department of Periodontology

Supervisor: Assoc. Prof.Hülya TOKER

2015, 72pages

The aim of this study was to investigate the effect of melatonin administered systemically on the alveolar bone resorption in an experimental periodontitis model, which is developed in osteoporotic rats, in terms of immunohistochemistry and morphometric.

Forthy-four Wistar rats were randomly divided into 6 experimental groups: control (C, n=6) group; osteoporosis (O, n=6) group; ligated periodontitis (LP, n=8) group; osteoporosis and periodontitis (O+LP, n=8); osteoporosis, periodontitis and 30 mg/kg/day melatonin (ML30, n=8) group; osteoporosis, periodontitis and 50 mg/kg/day melatonin (ML50, n=8) group. Ovaries of the rats were taken bilaterally to develop osteoporosis and the rats were kept 4 months. At the end of 4th month, 4/0 silk ligatures were placed submarginally around the mandibular first molar of each rat, to induce experimental periodontitis. 30 days after administration of the melatonin, all rats were sacrificed. Alveolar bone loss were measured as the distance from cemento-enamel junction to the alveolar bone crest at the stereomicroscope. Serum IL-6 levels were determined by ELISA. Histopathologically, inflammatory cell infiltration, numbers of osteoblasts and osteoclasts and immunohistochemically, receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) activity were evaluated.

According to the study results, the alveolar bone loss were significantly higher in the LP and O+LP groups compared to the other groups ($p<0.05$). Also, the alveolar bone loss was similar in C, O and ML30 groups. The highest number of osteoclast was

detected in the O+LP group and there were no significant differences in osteoclast numbers among ML30, ML50, C and O groups. While the lowest number of the osteoblast was observed in the C group, the highest one was detected among the ML30 and ML50 groups. While the RANKL activity was at highest level in the O + LP group, it was observed at lower levels in the groups that the melatonin was administered. There was no significant differences when IL-6 values of groups were compared.

Within the limits of this study, it is suggested that in the osteoporotic rat model with periodontitis sistemically administered melatonin prevents alveolar bone loss by the way of reducing RANKL activity and increasing osteoblastic activity.

Key words: Experimental osteoporosis, experimental periodontitis, alveolar bone loss, melatonin

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince yardımlarını esirgemeyen, beni destekleyen ve tecrübelerini paylaşan sevgili hocalarım *Doç. Dr. Hülya TOKER* ve *Yrd. Doç. Dr. Hakan ÖZDEMİR*'e,

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

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

Doktora öğrenimim boyunca yanımda olan desteğini esirgemeyen değerli bölüm hocalarıma, sevgili arkadaşlarıma ve tüm personele,

Hayatımın her aşamasında beni özveriyle ve içtenlikle destekleyen sevgili ailem *Seyhan, Reyhan, Nihan ALTINTEPE*'ye ve sevgili eşim *Özgür DOĞAN*'a

Teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
İÇ KAPAK	i
ONAY	ii
YÖNERGE	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1 Periodontal Hastalık.....	4
2.1.1 Deneysel Periodontitis Modelleri.....	7
2.2 Sitokinler.....	9
2.2.1 İnterlökin-6.....	10
2.3 Reseptör Aktivatör Nükleer Kappa B Ligandı (RANKL).....	11
2.4 Osteoporoz.....	13
2.4.1 Osteoporoz Patogenezi.....	16
2.4.2 Deneysel Osteoporoz Modelleri.....	18
2.5 Melatonin.....	20
2.5.1 Melatoninin Biyosentezi ve Metabolizması.....	21
2.5.2 Melatonin Reseptörleri.....	22
2.5.3 Melatoninin Biyolojik Etkileri.....	24
2.5.3.1 Antioksidan Etkisi.....	24
2.5.3.2 İmmünite Üzerine Etkisi.....	25
2.5.3.3 Uyku Üzerine Etkisi.....	25
2.5.3.4 Duygu Durumuna Etkisi.....	25
2.5.3.5 Cinsel Olgunlaşmaya Etkisi.....	26
2.5.3.6 Kanser Üzerine Etkisi.....	26
2.5.3.7 Termoregülasyona Etkisi.....	26
2.5.3.8 Kardiyovasküler Sisteme Etkisi.....	27
2.5.3.9 Anti-Enflamatuvar Etkisi.....	27
2.5.3.10 Kemik Üzerine Etkisi.....	27
2.5.4 Melatoninin Terapötik Dozları ve Yan Etkileri.....	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1 Deneysel Osteoporoz Oluşturulması.....	30
3.2 Deneysel Periodontitis Oluşturulması.....	30
3.3 Melatonin Uygulanması.....	31
3.4 Sakrifikasyon.....	31
3.5 Ratlardan Serum Elde Edilmesi.....	32
3.6 ELİZA Prosedürü.....	32
3.7 Morfometrik Değerlendirme.....	32
3.8 Histopatolojik İşlemler.....	33

3.9 İstatistiksel Değerlendirme.....	34
4. BULGULAR.....	35
4.1 Morfometrik Ölçümler.....	35
4.2 Histopatolojik Değerlendirme.....	37
4.3 İmmünohistokimyasal Analizler.....	42
4.4 Biyokimyasal Analizler.....	44
5. TARTIŞMA.....	45
6. SONUÇLAR.....	55
7. KAYNAKLAR.....	56
İZİNLER.....	71
EK 1. Cumhuriyet Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı.....	
ÖZGEÇMİŞ.....	72

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1 Osteoklast Farklılaşma Yolu.....	12
Şekil 2.2 Melatoninin Kimyasal Yapısı.....	20
Şekil 2.3 Melatonin Sentez Basamakları.....	21
Şekil 3.1 Çalışma Dizaynı Şeması.....	31
Şekil 4.1 Gruplara Ait Alveoler Kemik Kaybı Ortalamaları (mm).....	35
Şekil 4.2 Gruplara Ait Alt Sağ 1. Molar Dişlerin Stereomikroskop Görüntüsü.....	36
Şekil 4.3 Gruplara Ait Osteoklast Sayısı Dağılımı (n).....	37
Şekil 4.4 Gruplara Ait Osteoblast Sayısı Dağılımı (n).....	38
Şekil 4.5 Gruplara Ait Enflamatuvar Hücre İnfiltratı Dağılımı (%).....	39
Şekil 4.6 Gruplara Ait Histolojik Kesitler.....	40
Şekil 4.7 Gruplara Ait RANKL Aktivitesi Dağılımı (%).....	42
Şekil 4.8Gruplara Ait RANKL İmmünohistokimyasal Boyama Görüntüleri.....	43

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Çizelge 2.1 Periodontal Hastalığın Risk Elementleri.....	6
Çizelge 2.2Dünya Sağlık Örgütünün Osteoporoz Değerlendirme Kriterleri.....	13
Çizelge 4.1 Gruplara Ait Serum IL-6 Düzeyleri.....	44

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AANAT	Arilalkilamin N-asetiltransferaz
BH4	Tetrahidrobiopterin
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
CBFA1	Çekirdek bağlayıcı faktör alfa-1
CD4 ⁺	Yardımcı ve düzenleyici T hücresi
COX	Siklooksijenaz
CRP	C-reaktif protein
DEXA	Dual enerji X-ışını absorpsiyometri
DOS	Dişeti oluğu sıvısı
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
ELİZA	Enzim Bağlı İmmunosorbent Analizi
G-CSF	Granülosit koloni stimülatör faktör
G-MCSF	Granülosit-makrofaj koloni stimülatör faktör
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HE	Hematoksilen-Eozin
HIOMT	Hidroksiindol-O-metiltransferaz
IFN	İnterferon
IL	İnterlökin
KMY	Kemik mineral yoğunluğu
LT	Lenfotoksin
M-CFS	Makrofaj koloni stimülan faktör
ML	Melatonin
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
NAS	N-asetilserotonin
NAT	N-asetiltransferaz
NO ⁻	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
O ₂ ⁻	Süperoksit anyonu
OH ⁻	Hidroksil
ONOO ⁻	Peroksinitrit
OPG	Osteoprotegerin
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PPAR- γ	Peroksizom proliferatör ile aktive edilen reseptör- γ
PTH	Paratiroid hormon
PVN	Paraventriküler nükleus
RANK	Nükleer faktör kappa b'nin reseptör aktivatörü
RANKL	Nükleer faktör kappa b'nin reseptör aktivatör bağlayıcısı
SCN	Surprakiyazmatik nükleus
SS	Standart sapma
TGF	Dönüştürücü büyüme faktörü
Th	Yardımcı T hücresi
TNF	Tümör nekroz faktör
TRAP	Tartrat dirençli asit fosfataz

1. GİRİŞ

Periodontitis, mikrobiyal dental plağa karşı dişi destekleyen dokuların vermiş olduğu enflamatuvar yanıt sonrasında periodontal dokularda geri dönüşü olmayan doku yıkımı ve diş kaybının gözleendiği kronik enfeksiyöz bir hastalıktır [1]. Periodontitiste diğerkronik hastalıklarda olduğu gibi doku yıkımında birbirini takip eden aktif ve pasif dönemler vardır [2, 3]. Periodontal hastalığın ilerleme süreci kişiye göre değişiklik göstermektedir ve farklı bireylerde ve/veya aynı bireyde farklı oral bölgelerde doku yıkımı farklı seviyelerde gerçekleşebilir [1]. Periodontitisin oluşmasında birçok lokal, çevresel ve sistemik faktörlerin rol oynamasına karşın primer etiyolojik faktör mikrobiyal dental plak ve ürünleridir, fakat hastalığın patogenezinin açıklamasında mikrobiyal dental plak tek başına yeterli değildir [4]. Belirli anaerobik bakterilerden oluşan mikrobiyal dental plağın biyofilm olarak organize olmasıyla başlayan enfeksiyöz süreç periodontal savunma ve yıkım mekanizmaları arasında dengesizliğe yol açarak, periodontal bağ doku ve alveoler kemikte yıkım meydana getirir[5]. Periodontal dokuların yıkımında iki mekanizma olduğu saptanmıştır. Bu mekanizmalardan birincisi, bakterilerin ürettiği toksik maddeler, proteazlar ve endotoksinlerle yapmış olduğu doğrudan yıkıcı etkidir. İkincisi ise konak tarafından üretilen enflamatuvar mediyatörlerin aracılık ettiği dolaylı yıkıcı etkidir [6]. Dişeti dokusunda sınırlandırılmayan enflamatuvar yanıt artmaya devam ederek komşu alveoler kemik dokusuna yayılır, enflamasyonun alveoler kemiğe yayılmasıyla bağ doku ve alveoler kemikte kayıp gerçekleşir [7].

Osteoporoz, kemik kütlelerinde azalma ve kemikte mikro yapısal düzeyde değişikliklerle karakterize bir hastalık olup kemik kırılabilirliğinde artışa ve kırık risklerinin artmasına neden olur [8]. Osteoporoz tanımlamaları, ilk olarak 1829'da Jean Georges Lobstein tarafından gözeli kemik olarak, daha sonra 1948'de Albright tarafından kemik içinde çok az kemik olarak yapılmıştır [9]. Osteoporoz dünyada en sık görülen kemik hastalığı olup 80 yaş üzerindeki kadınlarda %70 oranında görülmektedir [10]. Hastalıkla beraber kalça ve omurga kırıkları görülmekte, mortalite ve morbidite artmakta, yaşam kalitesi azalmaktadır.

Periodontal hastalık ve osteoporoz arasındaki ilişki ilk olarak 1960 yılında rapor edilmiştir [11]. Osteoporoz üzerinde olumsuz etkisi olduğu bilinen cinsiyet, sigara, yaş gibi risk faktörlerinin periodontal hastalıkta hazırlayıcı etkenler arasında olduğu çeşitli

çalışmalarla belirtilmiştir [12-14]. Tezal ve arkadaşları postmenopozal kadınlarda iskeletsel kemik mineral yoğunluğu ile periodontal hastalık parametrelerinden klinik ataşman kaybı, interproksimal alveoler kemik kaybı, cep derinliği, supragingival plak, sondalamada kanama ve diştaşı miktarları arasındaki ilişkiyi araştırmıştır. Yaş, cinsiyet, ırk, menopoz yaşı, östrojen tedavisi, sigara içimi, vücut kütle indeksi ve supragingival plağın etkileri kontrol altına alındıktan sonra, postmenopozal dönemde olan kadınlarda sistemik kemik kaybının alveoler kemik kaybıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir [15]. Son dönemde yapılan bir çalışmada ise postmenopozal kadınlar kemik mineral yoğunluklarına göre osteoporoz, osteopeni ve kontrol grubu olmak üzere üç gruba ayrılmıştır. Osteoporozlu grupta alveoler kemik kaybı ortalamasının diğer gruplara göre daha fazla olduğu ve her üç grupta periodontal parametreler (cep derinliği, ataşman seviyesi) arasında anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır [16].

Osteoporoz ve periodontitis ilişkisini gösteren çalışmaların aksine, Hildebolt ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada orta veya şiddetli periodontiti olmayan postmenopozal kadınlarda ataşman kaybı, diş kaybıyla ilişkili bulunurken, kemik mineral yoğunluğu ile ilişkili bulunmamıştır [17]. Ayrıca bir diğer çalışmada osteoporozlu ve normal kemik mineral yoğunluğuna sahip kadınlarda cep derinlikleri, dişeti çekilme miktarları, marjinal kemik seviyeleri, dişeti kanama skorları karşılaştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda osteoporoz ve kontrol grubu arasında cep derinlikleri, dişeti çekilme miktarları, marjinal kemik seviyeleri, dişeti kanama skorları açısından anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir[18].

Periodontal hastalığın patogeneğinde konak-mikrobiyal etkileşimi hakkındaki bilgiler gün geçtikçe artmaktadır. Bu durum konak cevabı ile konak modülasyon ajanlarının hedef alınarak periodontitis için yeni terapötik stratejileri keşfetmekte fırsat yaratmaktadır. Bu terapötik stratejiler hem anti-mikrobiyal tedaviyi hem de konak modülasyon terapisini içermektedir. Konak modülasyon ajanları, iyileşme sürecinde periodontal sağlık ve hastalığın ilerleyişi arasındaki dengenin kurulmasına yardımcı olmaktadır. Konak modülasyonunun, antiproteinazlarla[19], anti-enflamatuvar ilaçlarla [20] prostaglandinlerin ve pro-enflamatuvar sitokinlerin üretiminin engellenmesiyle [21], kemik koruyucu ajanlarla osteoklast aktivasyonunun inhibe edilmesiyle sağlanabileceği bildirilmiştir [22]. Ayrıca günümüze kadar birçok antioksidan ve anti-enflamatuvar etkili ajanların periodontal hastalıkta oluşan kemik kaybını önlemedeki deneysel etkinlikleri araştırılmıştır [23-26].

Ana görevi, vücudun biyolojik saatini koruyup ritmini ayarlamak olan melatonin, vücutta birçok biyolojik ve fizyolojik süreçte yer alır. Melatonin, pineal bezin özellikle karanlık fotoperiyotta sentezlenen en önemli hormonudur. Melatonin üretildikten sonra yüksek lipofilik ve hidrofilik özelliğinden dolayı çok hızlı bir şekilde kana karışır ve beyin omurilik sıvısı da dahil olmak üzere bütün vücut sıvıları ve dokularına dağılır. Melatoninin vücutta birçok önemli görevi vardır. Bunların başında sirkadiyen ritmin [27], immünitinin [25] ve uykunun düzenlenmesi [28], antioksidan [29], anti-enflamatuvar [30], anti-viral [31], anti-kanseröz[32] ve kemik yıkımını azaltıcı[33]etkileri gelir.

Melatoninin serbest radikalleri temizleyici, anti-enflamatuvar ve kemik yapımını düzenleyici rolü nedeniyle periodontolojide terapötik bir ajan olarak kullanılabileceği düşünülmüştür [25, 34]. İnsan vücudundan salınan, dişeti oluğunda ve tükürükte bulunan melatoninin hastalıklı periodontal dokularda (periodontitiste) düşük düzeyde olduğu tespit edilmiştir [34]. Deneysel periodontitis oluşturulan ratlarda sistemik olarak melatonin uygulamasıyla, enflamatuvar cevabın azaldığı ve antioksidan konsantrasyonlarını arttırarak periodontal dokularda oksidatif hasarı azalttığı gösterilmiştir [25]. Ayrıca, farmakolojik dozlarda melatonin kemik kütleini, RANKL ile ilişkili osteoklast yapımını ve aktivasyonunu baskılayarak arttırır [35].

Yapılan çalışmalarda melatoninin kemik yapımı ve stimülasyonunda önemli bir mediyatör olduğu gösterilmiştir [33, 36]. İn vitro koşullarda, melatoninin mikromolar konsantrasyonlarda sentezi insan osteoblastlarındaki tip 1 kollajen liflerin proliferasyonunu stimüle ettiği bulunmuştur [37].Melatonin seviyesi yaşla birlikte azalmaktadır, bu nedenle menopoz sonrası ve yaşlılık osteoporozu gibi yaşa bağlı hastalıklarda melatoninin etkisi olabileceği düşünülmektedir[38].

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Periodontal Hastalık

Periodontal hastalık; dişleri çevreleyen destek dokuların bakteriyel enfeksiyonlara karşı verdiği lokalize enflamatuvar reaksiyonlar ile karakterize kronik bir hastalıktır [39]. Periodontal hastalık; gingivitis ve periodontitis olarak iki ana gruba ayrılır. Gingivitis, dental plak ve konak arasındaki etkileşim sonucunda gelişen, klinik ataşman kaybına neden olmayan, hiperemi, ödem ve kanama ile karakterize enflamatuvar dişeti hastalığıdır [40]. Periodontitis ise; periodontal dokularda geri dönüşümsüz doku yıkımıyla karakterize olup hastalığın seyri boyunca doku yıkımında aktif ve pasif dönemler izlenir. Periodontitisin tanısı için sondalama derinliğinde artış, ataşman kaybı ve radyografik olarak kemik kaybının olması gerekmektedir. Periodontitis multifaktöriyel bir hastalıktır ve mikrobiyal dental plak spesifik patojenler için bir barınak olup periodontitis için birincil etiyolojik faktördür [41, 42]. Ek olarak sistemik hastalıklar, bazı genetik polimorfizmler, sosyo-ekonomik veya eğitim durumları, sigara tüketimi ve psikolojik stres ile periodontitis arasında pozitif ilişkiler bildirilmiştir [43, 44].

Hastalık gelişiminde rol alan periodontopatojen bakteriler sahip oldukları virülans faktörleri ile konak dokularda yıkım meydana getirmektedir. *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Wolinella recta*, *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus micros*, *Capnocytophaga* ve *Prevotella intermedia* periodontopatojen olarak tanımlanmıştır [45]. Periodontopatojen bakterilerin periodontal dokularda yaşamlarını sürdürebilmeleri ve yıkım meydana getirebilmesi için kolonize olmaları gerekmektedir. Bu bakterilerin kolonize olabilmeleri için, periodontal dokulara tutunmaları, çoğalmaları, aynı ortamı paylaştığı diğer bakterilere karşı üstünlük kurmaları ve konak savunma mekanizmalarına karşı kendilerini korumaları gerekmektedir [45].

Oral hijyen uygulamaları bırakıldığında mikroorganizmalar hızlı bir şekilde diş yüzeyinde kolonize olur. Takiben birkaç gün içinde gingivitisle ilgili mikroskobik ve klinik enflamatuvar bulgular izlenmeye başlanır. Mikrobiyal dental plak, esas olarak dişeti kenarıyla olan ilişkisine göre supragingival ve subgingival plak olarak adlandırılır. Supragingival plak, dişlerin klinik kronları üzerinde, subgingival plak ise dişeti oluşu ve periodontal cep içinde yerleşmiştir. Gingivitis sonucu oluşan dişetindeki

ödem ve gingivite var olan cep formasyonu supragingival plağın subgingival plağa dönüşmesine neden olur [46]. Subgingival plak supragingival plaktan farklı içeriğe sahip olup; Gram (+) ve Gram (-) koklar, çomaklar, filamentöz bakteriler gözlenir. Yaklaşık 700 farklı tür bakteri dişeti oluğunda bulunmaktadır [47]. Periodontal hastalık nedeniyle cep derinliği arttıkça subgingival plağın mikrobiyolojisinde de değişiklikler olur. Sağ ceplerdeki plak birikimi diş yüzeyindekinden farklı olmayıp filamentöz bakteriler baskındır. Bunun yanında kok ve çomaklar da bulunur. Cebin derinliklerine doğru gidildikçe filamentöz bakteriler azalırken spiroketler ve kamçılı bakteriler artmaktadır[45, 48, 49].

Dentogingival birleşimdeki bakteriyel plağa karşı oluşan enflamatuvar yanıt, bakteriyel enfeksiyona karşı temel savunma mekanizmasıdır. Enflamatuvar yanıt başlangıçta akut fakat bakteriyel birikim konak savunmasıyla uzaklaştırılmazsa, kronik enflamasyona dönüşür. Enflamatuvar hücre infiltratı; plazma hücreleri, lenfosit, makrofaj ve nötrofilleri içerir. Bu hücrelerin akümüasyonu, fibroblast sayısındaki, kollajen ve matriks komponentlerinin yoğunluğundaki belirgin düşüşle ilişkilidir. Plak birikiminin devam etmesiyle arterlerdeki dilatasyona ve vasküler proliferasyona bağlı olarak bölgeye daha fazla kan gelir böylece nötrofil ve makrofaj infiltrasyonu artar. Lezyonun ilerlemesiyle birleşim epiteli, cep epiteline dönüşür. Plağın, kron ve kök yüzeyindeki sement boyunca apikale ilerlemesiyle periodontal cep derinleşir. Enflamatuvar hücre infiltratı laterale ve apikale doğru genişler. Bu safhada, osteoklastik aktivite sonucu alveoler kemiğin yıkımı histolojik olarak gözlenir [49].

Periodontal dokuların yıkımında iki mekanizma olduğu tespit edilmiştir. Birincisi; bakterilerin ürettikleri toksik maddeler, proteazlar ve endotoksinlerle yapmış olduğu yıkıcı etkidir. İkincisi; konak tarafından üretilen enflamatuvar mediyatörlerin aracılık ettiği dolaylı yıkıcı etkidir [6]. Kemik yıkımına neden olan mekanizmaları harekete geçirecek enflamatuvar mediyatör konsantrasyonları salınan pro-enflamatuvar sitokin seviyelerine bağlıdır [50].

Sistemik hastalıklarla birlikte genetik ve çevresel faktörler, kötü alışkanlıklar hem periodontal hastalığın patogenezini hem de konağın tedaviye verdiği cevabı etkileyen ve değiştiren faktörlerdir [6]. Periodontal hastalığın ortaya çıkışında bazı risk elementleri rol oynamaktadır. Bunlar risk faktörleri, bireysel risk belirleyicileri, risk indikatör ve risk işaretleri olup çizelge 2.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1 Periodontal hastalığın risk elementleri [4]

Risk faktörleri	Risk belirleyicileri	Risk indikatörleri	Risk işaretleri
-Sigara içmek -Diyabet -Patojenik bakteriler -Diş üzerindeki mikrobiyal birikintiler	-Genetik faktörler -Yaş -Cinsiyet -Sosyo-ekonomik durum -stres	-HIV/AIDS -Osteoporoz -Diş hekimi ziyareti azlığı	-Periodontal hastalık hikayesi -Sondalama sonrası kanama

1) Risk faktörleri: Var olduklarında bir bireyin hastalığa yakalanma olasılığını artıran çevresel, davranışsal veya biyolojik faktörlerdir.

2) Risk belirleyiciler: Bireye ait değiştirilemeyen risk faktörlerini kapsar.

3) Risk indikatörleri: Gruplar arası çalışmalarda belirlenmiş olan ancak uzun dönem çalışmalar ile teyit edilmemiş olan risk faktörleridir. Bunlar olası hastalık yapma ihtimali olan veya hastalık yapan risk faktörleridir.

4) Risk işaretleri: Artan hastalık riski ile ilişkili olmalarına rağmen hastalığa neden olmazlar. Bu faktörler de gruplar arası ve uzun dönem çalışmalar sonucunda saptanmışlardır.

Periodontal sert ve yumuşak doku yıkımını önlemek için farklı materyallerin kullanımına ilişkin çalışmaların sayısı giderek artmaktadır[23, 26, 51]. Bu terapötik yaklaşımlardan biri matriks metalloproteinazlarına karşı konak cevabını modüle eden ajanlardır. Periodontal tedavide kullanılan en büyük anti-proteinaz tetrasiklidir. Tetrasiklinin antimikrobiyal aktivitesi vardır ve nötrofil, osteoklast, matriks metalloproteinazların inhibisyonunu sağlamaktadır. Tetrasiklinler, kimyasal olarak değiştirilerek antimikrobiyal olmayan analogları geliştirilmiştir. Subantimikrobiyal doz doksisisiklinler kollajenazlarınaktivitesini engeller. Kullanımları güvenilir olup yan etki ve mikroorganizmalara karşı direnç geliştirmeden periodontal tedaviye yardımcı olarak etkili bir şekilde kullanılmaktadır [52].

Diğer bir terapötik ajan olan bifosfonatlarosteoporoz ve kemik rezorpsiyonuyla ilgili hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır [53].Yapılan çalışmalarda bifosfonatlar topikal olarak uygulandıklarında, postoperatif kemik dolununun yüzdesinin anlamlı bir şekilde arttığı rapor edilmiştir [54, 55].Bifosfonatlar, osteoblast farklılaşmasını artırır, osteoklast gereksinimi ve aktivitesini inhibe ederler [56].Cerrahi olmayan periodontal tedavilerde bifosfonat terapisinin periodontal kemik kütleini korumada uygun bir ek tedavi olup kinik ataşman seviyesini arttırdığı, sondalamada kanamayı ve cep derinliğini

azalttığı gösterilmiştir [22]. Bununla beraber yan etkileri kullanımını sınırlandırmaktadır.

Non-steroid anti-enflamatuvar ilaçlar siklooksijenaz izozimlerinin aktivitelerini bloke ederler ve birçok çalışmada bu ilaçların (flurbiprofen, naproksen) gingivitis ve periodontitisin ilerleyişini inhibe ettiği gösterilmiştir [20, 57]. Fakat siklooksijenaz inhibitörlerinin gastrointestinal ve kardiyovasküler sistemde istenmeyen yan etkileri bulunmaktadır[58]. Özellikle uzun süreli olarak siklooksijenaz-2 inhibitörü kullanımının hastaların önemli bir çoğunluğunda hipertansiyon, ödem ve konjestif kalp yetmezliğinin gelişimiyle bağlantılı olduğuna değinilmiştir [52]. Non-steroid anti-enflamatuvar ilaçlar lipofiliktir ve gingival dokulardan iyi emildiklerinden topikal uygulanmaları da mümkündür.

Pro-enflamatuvar (interlökin-1, interlökin-6) ve anti-enflamatuvar sitokinler (interlökin-4, interlökin-10, interlökin-11) konak immün cevabının oluşturduğu yan etkilerin kontrolünde büyük bir potansiyele sahiptirler. Dolayısıyla konak modülasyon terapisine karşı sitokinlerin kullanımı periodontal hastalıkların tedavisi için etkili bir strateji olabilir. İnterlökin-1 β (IL-1 β) ve tümör nekroz faktör- α (TNF- α) antagonistlerinin bağ doku atışman kaybını, alveoler kemik kaybını ve periodontal hastalığın ilerlemesini önemli derecede yavaşlattığı çalışmalarda gösterilmiştir [21, 59, 60]. Bu çalışmalardaki klinik, radyolojik ve biyokimyasal bulgular IL-1 β ve TNF- α antagonistlerinin enflamatuvar hücre infiltratının alveoler kret boyunca ilerlemesini engellediğini ve osteoklastları inhibe ettiğini göstermiştir. Martuscelli ve arkadaşları [61] rekombinant insan interlökin-11'i subkutanöz enjeksiyonla deneysel periodontitis oluşturulmuş köpekler 8 hafta boyunca uygulamış, atışman ve radyografik olarak alveoler kemik kaybının azaldığını göstermişlerdir.

2.1.1 Deneysel Periodontitis Modelleri

Deneysel çalışmalarda elde edilen sonuçların insanlara uyarlanabilmesi için insandakine benzer bir anatomiye sahip olan ve çalışma modellerinde insanı taklit edebilecek bir deney hayvanı seçmek önemlidir. Deneysel hayvan modelleri etik kurallardan dolayı dikkatli bir şekilde kullanılmalıdır [62, 63]. Primatlar, köpekler, sıçanlar, tavşanlar, domuzlar, hamsterlar ve dağ gelincikleri deneysel periodontitis modelinde yaygın olarak kullanılan hayvanlardır.

Küçük hayvan modelleri (sıçan veya hamster) periodontal araştırmalarda sıkça kullanılmaktadır ama bu çalışmalar ağırlıklı olarak bakteriyoloji ve immün yanıt üzerine

odaklıdır. Ratlarda gözlenen gingivitis varlığı periodontal yıkımın sistematik habercisi değildir. Başlangıç aşamasında enflamasyon sadece birleşim epitelinin etrafına yerleşir. Bu bölgede yüksek fagositik aktivite ve koruyucu nötrofil bariyer vardır. Ülsere birleşim epiteliyle karakterize olan akut interdental enflamasyonda, bağ dokudaki nötrofil ve osteoklastik aktivite artışı doğumdan itibaren 100 günlük hayvanların %10'unda görülmektedir [64]. Ratlarda periodontitis bulaşıcı bir süreç olarak görünür. Çeşitli periodontal patojenler (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Capnocytophaga*, *Eikenella corrodens*, *Actinomyces viscosus*, *Streptococcus sobrinus* gibi) inokülasyon veya enjekte edilerek periodontal lezyonlar indüklenebilir [65]. Bakteriyel inokülasyona karşı gingival yanıt kronik değil akuttur ve immün infiltrat içerir. Enjeksiyondan sonra periodontal dokularda yıkım oldukça hızlıdır. İnoküle edilen gram negatif bakteriler zayıf bir enflamatuvar yanıtı indükler ve bu insanlarda bulunanla benzer değildir. Gingival dokularda plazma hücreleri yoktur, başlıca nötrofil ve az sayıda lenfosit vardır. Bu yüzden doku yıkımı ile konak yanıtı farklıdır ve uygulanan bakteriyel ajanın türüne bağlıdır.

İnokülasyon ve enjeksiyonla periodontal lezyon oluşturma dışında dişlerin etrafına ligatür yerleştirilerek veya karbonhidrat diyeti verilerek de bu patoloji sağlanabilir [66]. Ligatür yerleştirilmesi doku bütünlüğünün azalmasına, yoğun konak-plak ilişkisine ve plak oluşumunu destekleyen bir faktör olarak bakteri sayısında artışa neden olarak dentogingival bölgede mekanik travma oluşturur [67]. Bu deneysel model, histolojik yöntemler kullanılarak uzun periyotlarda hastalığın evrimini incelemek için uygun değildir. Çünkü ratlarda dişlerin büyümesi ve migrasyonu devam etmektedir.

Tipik kemirgen dentisyonunda her bir yarım çenede bir kesici diş ve 3 tane molar diş vardır. Kesici dişler köksüzdür ve sürekli erüpsiyona uğrar. Ratlardaki dişeti alanının yapısı, birleşim epitelinin diş yüzeyine bağlanması ve sığ dişeti sulkusu insanlardakiyle oldukça benzerdir [68]. Fakat insanlarda sulkuler epitel keratinize değilken ratlarda keratinizedir [69]. Yapısal farklılıklara rağmen enflamatuvar hücre eksüdasyonları, bakteriyel endotoksinler ve yabancı cisimler için birleşim epiteli insanlarda olduğu gibi bir geçiş yoludur. İnsanlarda lezyonlar kök yüzeyi boyunca uzanırken ratlarda lezyonun en apikal bölgesi interdental dokuların merkezi boyunca lokalizedir. Kemik kaybı birleşim epitelinin apikale migrasyonu olmadan da oluşabilir [70].

Kemirgenlerde üreme ve barınma giderleri nispeten düşüktür, istatistiksel analizler için yeterli sayıda kullanılarak çalışma yapmayı mümkün kılar. Bununla

beraber sürekli oklüzal erüpsiyon ve diş kökleri üzerinde kemik apozisyonu olduğu için deney modellerinin oluşturulmasını, sonuçların analizini zorlaştırır ve sonuçlarda önemli bir yanılmaya neden olabilir.

2.2 Sitokinler

Çeşitli hücre tipleri tarafından üretilen ve salgılanan sitokinler birer polipeptittir. Yapısal olarak hormona benzemekle birlikte tam olarak bir hormon değildir. Enflamasyon, hücre büyümesi, iyileşmesi ve yaralanmaya karşı sistemik yanıtı da içine alan immün ve enflamatuvar olayları düzenlerler [71]. Farklı fonksiyon ve etkilere sahip olsalar da, bazı ortak özelliklere sahiplerdir [72]. Sitokinler, doğal ve spesifik immüntenin başladığı fazda üretilirler ve etkileri sistemik veya lokaldir. Bazıları klasik hormon gibi davranırlar ve belli hücreler tarafından kana veya çeşitli hücresel sıvılara salgılanıp vücudun diğer bölgelerindeki hücresel reseptörlerine bağlanırlar. Diğerleri ise daha lokalize olmuş etkiler gösterirler. Bunlar otokrin (bir hücre tarafından salgılanan sitokinin aynı hücre üzerine etkisi) ve parakrin (belli bir hücre tarafından salgılanan sitokinin yakındaki komşu hücreye etkisi) etkilerdir. İki sitokin birbirlerinin etkisini ortadan kaldıracaktır (antagonizm), arttırabilir (sinerji) veya değişik bir etkiye yol açabilir [72]. Belli bir biyolojik etkiyi sağlamak için gereken sitokin miktarı genellikle çok düşüktür [72]. Sitokinler genellikle depo edilmezler ve üretimleri yeni gen yazılması ile başlatılır [73].

Temel etkilerine göre sitokinler dört gruba ayrılırlar [74];

1)Doğal bağışıklığa aracılık eden sitokinler:

- Tip 1 interferonlar (IFN)
- Tümör nekrotizan faktör (TNF)
- İnterlökin-1 (IL-1)
- İnterlökin-6 (IL-6)
- Kemokinler

2)Lenfosit aktivasyonu, büyüme, farklılaşma düzenleyicileri olarak T lenfositlerinin özel antijenleri tanımlarını sağlayan sitokinler:

- İnterlökin-2 (IL-2)
- İnterlökin-4 (IL-4)
- Dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β)

3)Bağışıklık aracılığıyla enflamasyonu dñzenleyen sitokinler:

-İnterferon- γ (IFN- γ)

-Lenfotoksin (LT)

-İnterlökin-5 (IL-5)

-İnterlökin-10 (IL-10)

-İnterlökin-12 (IL-12)

4)Olgunlaşmamış lökositin büyüme ve farklılaşmasına aracılık eden mediyatörler:

-c-kit-ligand

-Granülosit-makrofaj koloni stimülatör faktör (G-MCSF)

-Monosit-makrofaj koloni uyaran faktör (M-CSF)

-Granülosit koloni stimülatör faktör (G-CSF)

-İnterlökin-3 (IL-3)

-İnterlökin-7 (IL-7)

-İnterlökin-9 (IL-9)

-İnterlökin-11 (IL-11)

Hücresel bağışıklıkta etkili olan IL-2, TNF- α ve IFN- γ gibi sitokinler Th1 hücrelerinden salgılanırken, humoral bağışıklıkta rol oynayan IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 ise Th2 hücrelerinden üretilir [75]. TNF- α , IL-1, IL-6 ve IL-8 sistemik enflamatuvar yanıtı başlatan pro-enflamatuvar özellikte sitokinlerdir. Daha sonra ortaya çıkan IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 ise anti-enflamatuvar sitokinler olup sistemik enflamatuvar yanıtın kontrolünden sorumludurlar.

2.2.1 İnterlökin-6

IL-6 lenfoid ve non-lenfoid birçok hücre tipi tarafından üretilen pleotropik bir sitokindir [76]. IL-6 ve reseptörü kromozomal yerleşimi 7p21-14 (IL-6), 1 (IL-6 α), 5 ve 17 (gp130) olan genlerle kodlanmaktadır ve dört α -helikal uzun zincir içermektedir. B lenfosit uyarıcı faktör-2 olarak bilinen IL-6; T ve B lenfositler, monositler/makrofajlar, damar endotel hücreleri, fibroblastlar,epidermal Langerhans hücreleri, epitel hücreleri, nöronal hücreler, mezenşimal hücreler,mast hücreleri, osteoblastlar,mikroglialar, dendritik hücreler, adipositler ve keratinositler gibi birçok hücre grubu tarafından üretilmektedir [77, 78].

IL-6, enflamatuvar yanıtı aracılık eden önemli maddelerden biri olup hem pro-enflamatuvar hem de anti-enflamatuvar rolü vardır [79]. T ve B lenfosit gelişimi ve

farklılaşması ile antikor üretimini artırır, sitotoksik lenfositler için farklılaşma faktörü olarak görev yapar [78, 80, 81]. IL-6, nötrofil ve makrofajların olgunlaşmasını ve sitotoksik T lenfositler ile doğal öldürücü hücrelerin farklılaşmasını sağlar. Osteoklastların sayı ve fonksiyonunu artırarak kemik yıkımına neden olur [82, 83]. Endotoksinler, monosit ve fibroblastlarda IL-6 sentezini uyarır, yine aynı şekilde birçok virüs fibroblastlarda veya santral sinir sistemi hücrelerinde IL-6 üretimini indükler [83].

Yapılan çalışmalarda lokal (dişeti oluğu sıvısı ve tükürük) ve sistemik (serum) IL-6 seviyeleri sağlıklı kişilerle karşılaştırıldığında periodontitisli kişilerde daha yüksek düzeyde olduğu gösterilmiştir [84-86]. Serum IL-6 seviyesinin periodontal tedaviden etkilendiği gözlenmiştir. Kısa dönemde serum IL-6 düzeyi tedaviye bağlı olarak oluşan enflamatuvar yanıtla birlikte artmaktadır. Uzun dönemde ise periodontal durumdaki klinik gelişimlere paralel olarak düşüş gözlenmektedir [87, 88].

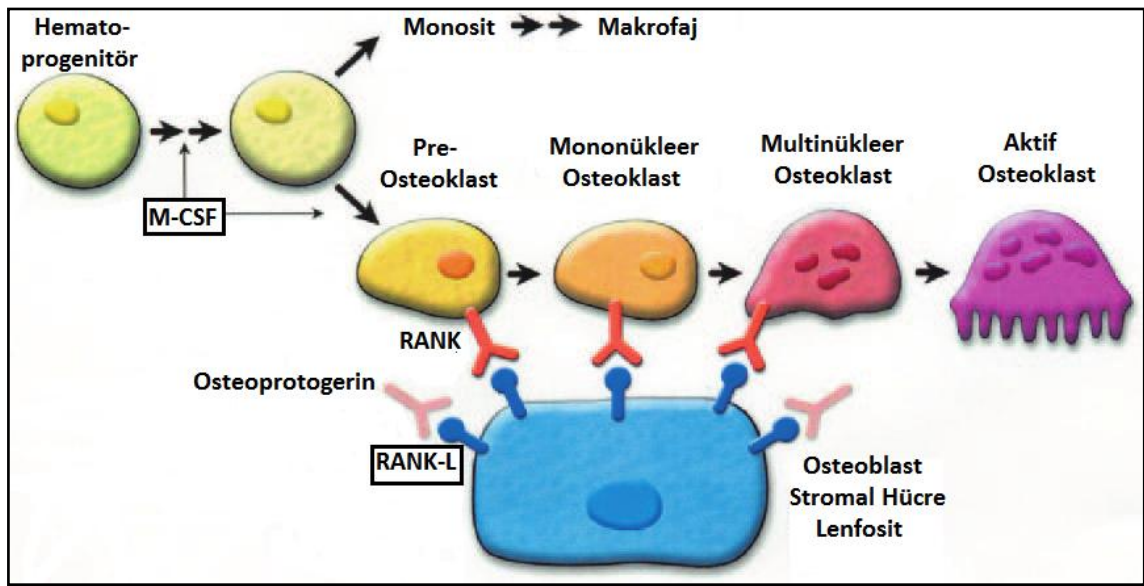
Periodontal lezyonlarda T hücreleri, makrofajlar, endotel hücreler ve fibroblast tipi çeşitli hücrelerin hem mRNA hem de protein seviyelerinde IL-6 eksprese ettiği gösterilmiştir [77, 89-91]. Ayrıca, IL-6'nın kemik döngüsünün lokal regülasyonunda önemli rol oynadığı ve östrojen eksikliği nedeniyle meydana gelen kemik kaybıyla ilişkili olabileceği bildirilmiştir [92]. Fare osteoblastik ve kemik iliği hücrelerinin, IL-6 ve çözünebilir IL-6 reseptörü ile eş zamanlı tedavisi sonucunda osteoklast formasyonunun önemli derecede indüklendiği in vitro çalışmalarda gösterilmiştir [93]. IL-6'nın patolojik olarak osteoklastik kemik rezorpsiyon aktivitesini ve osteoklastların formasyonunu stimüle ederek, kemik rezorpsiyonunda otokrin ve/veya parakrin faktör olarak hareket edebileceği öne sürülmüştür [94].

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

RANKL, normal ve patolojik durumlarda kemik rezorpsiyonunun anahtar aracı maddesi olup TNF ligand ailesine bağlı çözünen bir membran proteindir. Osteoblastlarda, lenf düğümü, timus, akciğer, dalak ve kemik iliğinde sentezlenir. Uyarılmış T ve dendritik hücrelerin yüzeyinde bulunan RANKL reseptörü RANK'a bağlanarak öncül osteoklastların olgun osteoklastlara farklılaşmasını, aktive olmasını, canlılıklarını sürdürmelerini sağlar ve kemik yıkımı gerçekleşir [95]. RANK ise osteoklastik öncü hücreler, B ve T hücreleri, dendritik hücreler ve fibroblastların dahil olduğu monosit/makrofaj sisteminde bulunur [96]. RANK'ın RANKL ile bağlanmak için reseptörleri bulunmaktadır [97]. Olgun osteoklastların oluşumu için bu bağlanma

gerekli görünmektedir. RANKL'in RANK ile bağlanmasının engellenmesi osteoklast oluşumunu azaltırken, osteoklast apoptozisine neden olmaktadır (Şekil 2.1)[98].

Glukokortikoidler, fibroblast büyüme faktörü-2, paratiroid hormon, bazı sitokinler (IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-11, IL-17, TNF- α) RANKL sentezini artırır ve düzenlerler. PGE₂, birçok mezenkimal transkripsiyon faktörü (CBFA1, PPAR- γ) ve 1,25-dihidroksi vitamin D3 gibi birçok faktör kemik rezorpsiyonuna sebep olurken, östrojen RANKL sentezini inhibe eder, osteoprotegerin üretimini artırır [99, 100]. İn vitro çalışmalarda osteoprotegerinin güçlü bir kemik koruyucu ajan, RANKL'in ise bir prerezorptif faktör olduğunu desteklemektedir [101, 102].



Şekil 2.1 Osteoklast farklılaşma yolu (Mc Cauley L. ve Nohutçu R., 2002)[103]

Kemik kütlesindeki denge osteoblast ve osteoklastların uyum halinde çalışmasıyla sağlanır. RANK/RANKL ise osteoblastlarda bulunan kemik kütlesini belirleyen yollardan biridir [99, 104].Kong ve arkadaşlarının [105] yaptığı çalışmada RANKL olmayan farelerde osteoklastların tamamen yok olduğu bununla birlikte osteopetrosis geliştiği gözlemlenmiştir.

Vernal ve arkadaşlarının [106] yaptığı bir çalışmada da periodontitiste gingival dokularda CD4⁺T hücrelerinin baskın hücre olduğu ve RANKL'ı monosit ve dendritik hücelere göre daha yüksek düzeyde eksprese ettikleri bulunmuştur. Kawai ve arkadaşlarının [107] yaptığı benzer çalışmada periodontitiste gingival dokularda B ve T hücrelerinin baskın hücre tipleri olduğu ve sağlıklı dokulara göre daha fazla RANKL eksprese ettiği gözlenmiştir.

2.4 Osteoporoz

Osteoporoz dünyanın birçok bölgesinde majör halk sağlığı problemlerinden biri olarak kabul edilmektedir [108]. Türkiye’de yapılan en son araştırmaya göre osteoporoz prevalansı 50 yaşlarında %3-4 oranında saptanırken, 80 yaşlarında bu oranın %30’un üzerine yükseldiği gösterilmiştir [109]. ABD’de ise 50 yaş ve üzerindeki insanların %55’inin (44 milyon) osteoporozlu olduğu bilinmektedir [110]. Bu önemli hastalığın erken teşhis edilebilmesi için Kemik Mineral Yoğunluğu (KMY) ölçümü çok önemli bir tanısal parametredir. KMY ölçümünde bugün için Dual enerji X-ışını absorpsiyometri(DEXA) yöntemi kullanılmakta olup osteoporozun tanısı ve tedavinin devamı için altın standarttır [111]. DEXA kırık oluşmadan önce osteoporoz ve/veya osteopeniyi saptar. Tekrarlanan ölçümlerle kemik kaybının hızını belirler, tedavinin etkinliği ya da başarısızlığı hakkında bilgi verir [112].

1996’da Amsterdam Dünya Osteoporoz Kongresi’nde alınan kararlara göre; osteoporoz tanımını DEXA kullanılarak elde edilen değerlere ve kırık varlığına göre yeniden düzenlenmiştir (Çizelge2.2). Bu son tanımlamaya göre osteoporoz tanımı için kırık şart değildir [113].

Çizelge 2.2 Dünya Sağlık Örgütü’nün osteoporoz değerlendirme kriterleri

Normal	Genç erişkine göreKMY’nin ve kemik mineral içeriğinin 1 standart sapmanın (SS) altında olması.
Osteopeni	KMY’nin genç erişkine göre -1,0 ile -2,5 SS arasında olması
Osteoporoz	KMY’nin genç erişkine göre -2,5 SS’dan fazla olması.
Yerleşmiş Osteoporoz	KMY’nin genç erişkine göre -2,5 SS’dan fazla olması ve ek olarak bir veya daha fazla kırık bulunması.

Osteoporozun risk faktörleri içerisinde, ırk, cinsiyet, düşük vücut kitle indeksi, sosyoekonomik durum, kişide ve annede geçirilmiş fragilite kırığı öyküsü, beslenme şekli, çay, kahve, sigara gibi alışkanlıklar,meslek, sedanter yaşam,bazı jinekolojik özellikler, kronik hastalıklar ve kullanılan ilaçlar, bilişsel fonksiyon ve ruhsal durum bozuklukları gibi faktörler yer almaktadır [114].

Osteoporozun Sınıflandırılması

1. Primer osteoporoz
2. Juvenil osteoporoz

3. Genç yetişkinlerin osteoporozu
4. İnvolyonel osteoporoz
 - a) Postmenopozal osteoporoz (Tip 1)
 - b) Senil osteoporoz (Tip 2)
 - c) PTH artışı ile birlikte olan tip (Tip 3)
5. Endokrin bozukluklarla görülen osteoporoz
 - a) Hipogonadizm
 - b) Hiperparatiroidizm
 - c) Hipertiroidizm
 - d) Diyabet
 - e) Cushing hastalığı
6. Gastrointestinal sistem bozukluklarıyla görülen osteoporoz
 - a) Gastrektomi
 - b) Malabsorbsiyon
 - c) İntestinal obstrüksiyon
 - d) Karaciğer hastalıkları
7. Diyete bağlı osteoporoz
 - a) Açlık
 - b) Protein, kalsiyum, çinko, C vitamini ve B12 eksikliği
8. İlaçlara bağlı oluşan osteoporoz
 - a) Heparin
 - b) Antikonvülzanlar
 - c) Metotreksatlar
 - d) Glukokortikoidler
9. Malign hastalıklarla görülen hastalıklar
 - a) Multipl myelom
 - b) Mastositozis
 - c) Lösemi
 - d) Lenfoma
10. Bağ dokusu hastalıklarıyla görülen osteoporoz
 - a) Romatoid artrit
 - b) Osteogenesis imperfekta
 - c) Ehler-Danlos sendromu

11. Diğerleri

- a) PGE₂ benzeri aktivitenin artması
- b) Alkol
- c) Sigara
- d) D vitamini azlığı
- e) İmmobilizasyon
- f) Gebelik

İdiyopatik juvenil osteoporoz 8 ile 14 yaşlarında ortaya çıkıp 2 ile 4 yıl içinde hızlı bir seyir izlemektedir. Büyüme durabilir. Endokondral ossifikasyon normal olmasına rağmen trabeküler kemikte poroz mevcuttur.

Genç yetişkinlerin idiyopatik osteoporozunun ise kadın ve erkekte tutulumu eşittir. Çoklu kırıklar gelişebilir. Serum kalsiyum, fosfat ve alkalen fosfataz seviyeleri normal seviyededir.

Tip 1 postmenopozal osteoporoz 50 ile 60 yaşlarında ortaya çıkmakta olup kadınlarda erkeklere göre altı kat daha fazla görülür. Paratiroid fonksiyonları azalmıştır. Trabeküler kemik kaybı hızlıdır. Bunun nedenleri ise düşük östrojen seviyeleri, osteoklastik aktiviteyi arttıran sitokin düzeyleri ve artmış osteoblast apoptozudur [115].

Tip 2 senil osteoporozu ise 70 yaş üzerinde bireylerde daha çok görülür ve kadınlarda erkeklere göre iki kat daha fazla rastlanır. Kemik kaybının hızı sabit olup hem trabeküler hem de kortikal kemiği etkiler. Kemik kaybından sorumlu iki mekanizma olup bunlar sekonder hiperparatiroidizm ve yaşa bağlı olarak azalmış osteoblastik aktivitedir [115].

Tip 3 involusyonel osteoporoz ise postmenopozal kadınlarda yaygın bir hastalık olup 50 yaşından sonra görülür. Yaşam boyu kırık görülme oranı %40'dan daha fazladır [109]. Kemik döngüsü hızlı ve PTH seviyesi yüksektir. Bu tip osteoporozun mekanizmasında 1 α hidroksilaz bozukluğu olduğu düşünülmektedir.

Furosemid grubu diüretikler, antikonvülsan ve kortikosteroid grubu ilaçların uzun süreli kullanımı yaygın kemik kayıplarına yol açarak fraktür gelişimine neden olabilir [116-118]. Ayrıca kemik yapımını baskılayarak, bağırsaklardan kalsiyum emiliminin azalmasına neden olurlar. Kemik yıkımı ve böbreklerden kalsiyum atılımını da arttırarak osteoporoz gelişimine yol açarlar [118-120]. Metotreksat [121] ve antikoagülan gibi ilaçların[122] da, kemik mineral yoğunluğu üzerinde olumsuz etkileri bulunmaktadır.

Alkol alımı mineral metabolizmasında değişikliklere neden olarak kemik kütlesinde kayıplar oluşturur. Kişide karaciğer hastalığı olmasa bile D vitamini düzeyi ve kalsiyum emilimi azalır, atılımı artar. Bu durum kemik yoğunluğunu azaltarak, fraktür riskini de arttırabilir[123].

Sigara kullanımı östrojen yapımını ve kullanımını azaltarak erken menopoza, dolayısıyla osteoporozu neden olmaktadır. Sigara tüketiminin genel olarak osteoporoz ve fraktür oluşumunda önemli bir risk faktörü olduğu bilinmektedir [116].

İmmobilizasyonun da, kemik kaybının bir etkeni olduğu ve hareketsiz yaşam tarzının artmış fraktür riskiyle ilişkili olduğu belirlenmiştir. Yapılan fiziksel aktivite kemiğe mekanik güç bindirir ve bu durum kemiğin dayanıklılığını arttırır. Hareketsiz yaşam tarzı devam ettikçe kemik kaybının ve kalsiyum atılımının artmasıyla osteoporozun ortaya çıkması öngörülebilir bir sonuçtur [117, 123, 124].

2.4.1 Osteoporoz Patogenezi

Osteoporoz patogenezinde doruk kemik kütlesi, kemik yapım-yıkım döngüsünün hızı ve kemiğin organik matriksindeki değişiklikler önemli rol oynamaktadır. Genetik yapı esas olarak doruk kemik kütlesini belirlese de diyetle yeterli kalsiyum ve D vitamini alımı, dengeli beslenme ve düzenli fiziksel aktivite gereklidir [125]. Doruk kemik kütlesi gereğinden fazla kalsiyum alınarak elde edilemez. Eğer yeterli kalsiyum alınmaz ise genetik olarak belirlenen doruk kemik kütlesine ulaşamaz. Genetik olarak belirlenen doruk kemik kütlesine 18–35 yaşları arasında ulaşılır. 30–35 yaşları arasında kemik kütlesi dengede tutulur. 40 yaşından sonra kemik kütlesinde fizyolojik kayıp başlar [126].

Östrojen, fizyolojik kemik döngüsünde kemik hücrelerinin yaşam sürelerini düzenleyerek ve osteoklastogenezisi azaltarak önemli bir rol oynar. Ayrıca osteoblastlarda bulunan osteoprotegerin salımını sağlayarak osteoklastların olgunlaşmasını engeller. Menopoz sonrası dönemde östrojen eksikliğine bağlı olarak osteoblastik aktivite azalır, osteoklastik aktivite artar. Bunun yanında osteositlerin yaşam süresi kısalmır. Östrojenin varlığı, TGF- α üretimine neden olarak osteoklastların apoptozisini hızlandırır. Östrojen eksikliğinde ise, pro-enflamatuvar sitokinlerin (IL-1, TNF- α , IL-6) salınmasında artış ortaya çıkmaktadır. Yalnız bu artış, enfeksiyon ya da doku yaralanmasında görülen sitokin artışına göre daha azdır [127]. RANKL ile aynı doğrultuda etkisi olan IL-1 ve IL-6da osteoklast apoptozisini önler ve osteoklastların yaşam sürelerini uzatır [128]. Kemik iliği stromal hücreleri ile osteoblastlardan

kaynaklanan M-CSF, RANKL gibi öncül osteoklastların olgun osteoklast olmaları için gerekli diğer bir sitokin olup TNF- α tarafından uyarılır.

Östrojen eksikliğinde serumdaki kalsiyum seviyesi artar. Böylece PTH'nin salgılanması baskılanır ve böbreklerden kalsitriol sentezinin azalmasına bağlı olarak kalsiyumun bağırsaktan emilimi azalır. Sonuç olarak kalsiyum dengesi bozulur ve kortikal kemiğe göre trabeküler kemikte daha fazla kayıp oluşur. Yaşlılığa bağlı osteoporozda ise asıl neden kemik kaybından çok kemik yapımının azalması olup kortikal kemikte kayıp daha belirgindir [129]. Primer osteoporozlu kişiler, sağlıklı kişilerle karşılaştırıldığında dolaşımdaki osteoklast prekürsör hücre sayılarının aynı olduğu ancak primer osteoporozlu kişilerde osteoklast rezorptif aktivitesinde önemli artış olduğu gösterilmiştir [130].

Günümüzde, periodontal hastalık ve osteoporoz dünyada milyonlarca kişiyi etkileyen, ilerleyen yaşla birlikte artan, çok sayıda kadın ve erkeği etkileyen hastalıklardır. Periodontal hastalık lokal, osteoporoz ise sistemik bir hastalıktır. Kemik kaybı her iki hastalığın da yaygın özelliğidir. Kemik kaybının sistemik ve lokal faktörler tarafından etkilendiği iyi bilinmektedir [131]. Her iki hastalıkta ortak bir patogenez yolağına sahip olabilir. Osteoporozun, periodontal hastalık üzerine dolaylı bir sistemik etkisi vardır, bu yüzden periodontal hastalığın patogenezinde bir risk göstergesi olarak kabul edilmektedir [4]. Osteoporozda dolaşımda artmış pro-enflamatuvar sitokinler (IL-1 β , TNF- α ve IL-6 gibi) lipopolisakkaritler gibi bakteriyel faktörlerle birleştiğinde periodontal hastalık oluşumunu ve ilerlemesini kolaylaştırabilirler [132, 133].

Periodontitis ve osteoporozla ilgili yapılan çalışmaların bazılarında dişeti çekilmesi, sondalamada kanama, diş ve alveoler kemik kaybı ve klinik ataşman seviyesiyle osteoporoz arasında anlamlı ilişki bulunmuşken [15, 134], bazı çalışmalarda ise bu iki hastalık arasında ilişki bulunmamıştır [135, 136].

Postmenopozal kadınlarda tüm vücut, kalça ve omurga densitesi ile diş kaybı arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir çalışmada sistemik kemik kaybındaki artış diş destekleyen alveoler kemiğin rezorpsiyonuna katkıda bulunarak diş kaybı için bir risk faktörü olabileceği öne sürülmüştür [137].

Mohammed ve arkadaşları, [134] sağlıklı ve düşük spinal kemik mineral yoğunluğuna sahip Kafkas ırka mensup postmenopozal kadınlarda düşük kemik mineral yoğunluğu ile klinik ataşman seviyesi ve dişeti çekilmesi arasında anlamlı bir ilişki olduğunu belirtmişlerdir.

Zıt olarak Pilgram ve arkadaşları [138] 3 yıl süre ile takip edilen östrojen replasman tedavisi gören 135 postmenopozal olarak sağlıklı kadında lomber omurga ve proksimal femurdaki kemik mineral yoğunluğu ile klinik ataşman kaybı arasında herhangi bir ilişki gözlememiştir.

Elders ve arkadaşları [135] alveoler kret yüksekliği, spinal kemik mineral yoğunluğu ve metakarpal kortikal kemik kalınlığı arasındaki ilişkiyi %21'i dişsiz olan 286 kadında incelemiş ve ortalama alveoler kret yüksekliği ile kemik mineral yoğunluğu, metakarpal kortikal kemik kalınlığı, yaş ve menopozdan sonra geçen süre arasında yüksek korelasyon olduğu fakat periodontitisin klinik parametreleri ile (sondamada kanama, cep derinliği, eksik diş sayısı) kemik mineral yoğunluğu arasında anlamlı bir ilişki olmadığını belirtmişlerdir.

Grodstein ve arkadaşları [139] yaşları 65 ile 69 arasında değişen 42.171 postmenopozal kadında hormon kullanımının diş kaybı riskini düşürdüğünü saptamışlardır.

Kribbs ve arkadaşları ise [140] mandibuler kemik kütlesinin yaştan önemli derecede etkilenmediğini fakat mandibuler kemik kütlesinin iskeletsel kemik kütlesiyle ilişkili olduğunu bulmuşlardır. Osteoporotik kırık hikayesi bulunan az sayıdaki hastada mandibuler ve iskeletsel kemik yoğunluğu araştırılmış, osteoporozlu kadınlarda periodontal ataşman kaybının önemli derecede fazla olduğunu rapor edilmiştir [141].

Kribbs ve arkadaşlarının [136] bir diğer çalışmasında osteoporozlu grupta sondalamada kanama, klinik ataşman seviyesi ve sondalama cep derinliğinde anlamlı bir fark olmadığı rapor edilmiştir. Başka bir çalışmalarında ise osteoporozlu kadınlarda sondalamada kanama ve sondalanabilen cep derinliği ile mandibuler kemik kütlesi arasında önemli derecede ilişki olduğunu bildirmişlerdir [142]. Buldukları bu tezat sonuçları ise, iskeletsel kemik hastalığının etkisinin bireysel varyasyonlar tarafından gizlenmiş olabileceği şeklinde savunmuşlardır.

2.4.2 Deneysel Osteoporoz Modelleri

Osteoporoz için hayvan modelleri, yeni tedavi seçeneklerinin araştırılmasında ve potansiyel terapilerin hızlı bir şekilde test edilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Östrojen eksikliğine bağlı osteoporotik kemikle ilişkili hastalıkların modellenmesinde ovariektomi uygulanan ratlar hastalığı taklit edebilmek için kullanılmaktadır. Bu model menopoz sonrası oluşan osteoporozdaki gibi ilerleyici kemik matriksinin kaybını sergiler [143, 144]. Ovariektomi sonrası ilk dönemde kemik rezorpsiyonu kemik

formasyonunu aştığından net bir kemik kaybı meydana gelir ama bir süre sonra kemiğin şekillenmesi rezorpsiyon ve formasyonu dengelendiği için stabil hale gelir [145]. Ovariectomi sonrası 60. güne kadar istatistiksel olarak anlamlı bir kemik kaybı lumbar vertebralarda saptanamaz [146]. Buna karşılık ovariectomi, uzun kemiklerin epifizlerinde, distal tibiaların metafizlerinde veya kuyruk omurunda kemik kütle kaybını indüklemeyebilir [147].

Osteoporoz oluşturma yöntemlerinden bir diğeri ise düşük kalsiyum diyetidir. Bu diyet yaklaşık %1 w/w'lik (ağırlıkça yüzde) kalsiyum içermektedir. Kalsiyum en yaygın kullanılan besin takviyesidir çünkü kemik kaybı meydana geldiğinde eksik olan mineraldir [148]. Kemik kendini sürekli biçimlendirir bu durum ise kalsiyumun yeni kemik içerisine sürekli emilmesi ve depolanması şeklinde olur. Düşük kalsiyum alımı kısa vadede belirgin bir semptom göstermez ancak uzun vadede kalsiyum eksikliği osteoporozu yol açabilir [149]. Ovariectomiye ek olarak düşük kalsiyum diyetinin alınımı osteoporotik hayvan modellerinde zamandan kazanç sağlar [150].

Osteoporoz modellerinde diğeri bir alternatif model ise farmakolojik ajanların kullanımınıdır. Bu ajanlara örnek olarak gonadotropin salgılatıcı hormon antagonisti, östrojen reseptör antagonisti ve aromataz inhibitörü verilebilir [150]. Bu ilaçlar kesildikten sonra etkileri geri dönüşümlüdür. Bu ajanların verilmesiyle hipogonadal osteoporoz modeli oluşturulur. Glukokortikoid indüklemesiyle oluşturulan deneysel osteoporoz modeli tutarsız sonuçlar vermiştir. Bazı çalışmalarda olgun sıçanlarda kemik kaybının tespit edilemediğini [151], bazı çalışmalar ise glukokortikoid alımıyla kemik kaybı arasında bir korelasyon olduğunu saptamışlardır [152].

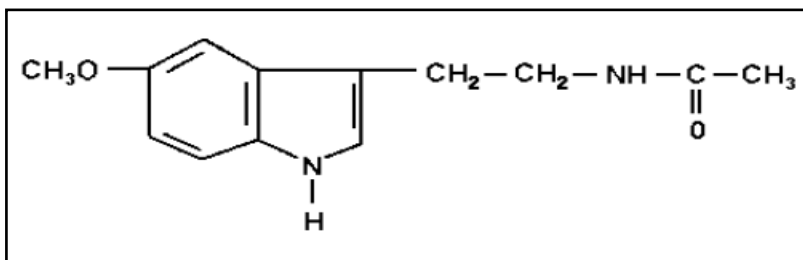
Farmakolojik ajanlara diğeri bir örnek ise retinoik asittir. Kolay uygulanması, kısa zaman gerektirmesi, yüksek başarı oranı ve tipik osteoporoz belirtileri oluşturması nedeniyle sık kullanılan modellerden biri olmuştur. Yüksek dozlarda vitamin A'nın (retinoik asit) ratların iskelet sistemi üzerinde toksik etkisi olduğu ve uzun kemiklerin diafiz bölgesinde spontan kırıklara neden olduğu gözlenmiştir [153]. Yapılan başka bir çalışmada yüksek dozda retinoik asitin yüksek dozda 1-3 hafta boyunca verilmesinin oksidatif strese neden olduğu, osteoporozda olduğu gibi kemik kütlelerinde sürekli bir azalma ve histomorfometrik yapılarda yapısal değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir [154]. Retinoik asitin osteoporoz modelinde kısa dönem etkisi uzun dönem etkisine göre daha iyidir. Retinoik asitin kısa dönem etkisi kansellöz kemikte kortikal kemiğe göre daha fazla kayıp oluşturur. Retinoik asit östrojen seviyesini düşürür, osteoklast

sayısını artırır, kemik rezorpsiyonunu artırır ve endokondral kemikleşmeyi baskılar[155].

Diğer bir yöntem ise immobilizasyon osteoporozudur. Immobilizasyon için birçok yöntem vardır bunlar ameliyatla hareketsizleştirme yöntemleri olup sinir, tendon ve spinal kord rezeksiyonu veya konservatif olarak uzuvların bandajlanması, kalıba alma ve askıya alma şeklindedir [150]. Cerrahi yöntemlerde kemik kaybı immobilizasyon metoduna göre daha hızlı gerçekleşmektedir [156]. Ayrıca immobilizasyon modelinde ovariektomize modelin aksine periostal kemik formasyonu kortikal kemikte sonlanır fakat endostal rezorpsiyon yavaş kemik kaybına neden olarak devam eder [150]. Bu iki yöntem kombine kullanıldığında her ikisinin de avantajları birleşerek daha hızlı kemik kaybına neden olurlar [157].

2.5 Melatonin

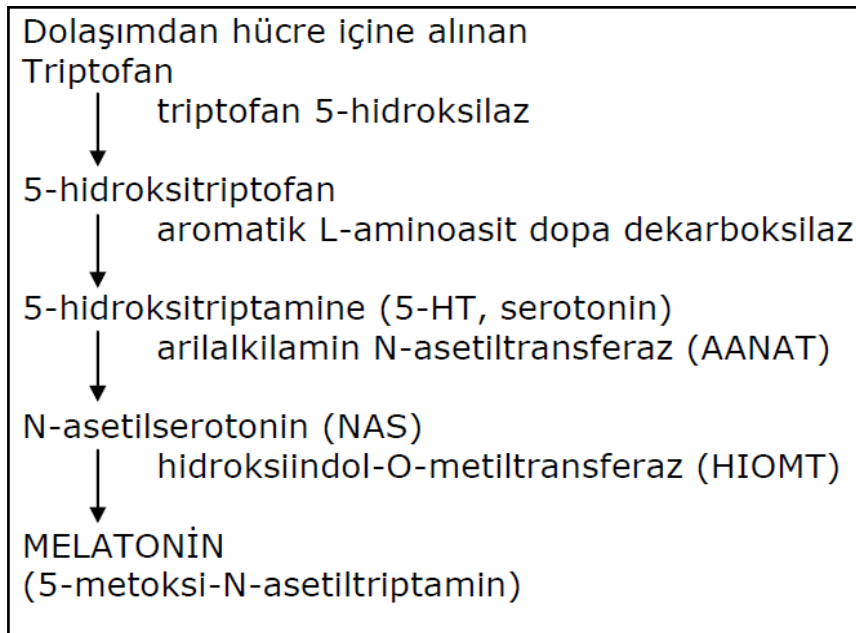
Pineal bez, önemli bir nöroendokrin organ olup endokrin aktivitesi, diğer endokrin organlardan farklı olarak sinirsel innervasyonla sağlanır [158]. Retinadan, pineal bez ışık uyarımları kompleks bir sinirsel yolla taşınır [159]. Pineal bezin parankimasında bulunan pinealositler, hücrelerin %85-90'ını oluştururlar ve bezin sekresyon fonksiyonundan sorumludurlar[158, 159]. Pineal bezden indolaminler ve peptidler olmak üzere iki grup endojen madde salgılanmaktadır. İndolaminler içerisinde ise en önemlisi melatonindir [159]. Pineal bezde melatoninin keşfi 1958'de Lerner ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir [160]. İki yüz otuz iki molekül ağırlıklı melatonin hormonu N-asetil 5-metoksi triptamin olarak da adlandırılır ve pineal bezden özellikle gece saatlerinde salgılanır (Şekil 2.2)[161]. Melatonin, memelilerin başlıca beyinde serebral yarıküreler arasındaki pineal bezden ve ayrıca over, lens ve kemik iliği hücreleri ile safra ve gastrointestinal sistemden sentezlenip salgılanan bir hormondur [162]. Vücutta biyolojik ve fizyolojik düzenlemelerde görev alır ama temel görevi vücudun biyolojik saatini koruyup ritmini ayarlamasıdır [163].



Şekil 2.2 Melatoninin kimyasal yapısı

2.5.1 Melatoninin Biyosentezi ve Metabolizması

Melatonin sentezinin basamakları şekil 2.3'te gösterilmiş olup birinci basamak triptofan aminositinin dolaşımdan hücre içine alınmasıdır [158, 159, 164]. Triptofan esansiyel bir aminoasit olup zorunlu olarak besinlerle dışarıdan alınması gerekmektedir. Triptofanın büyük çoğunluğu indol metabolizmasında kullanılırken geriye kalan küçük kısım ise protein sentezinde kullanılır [159]. Pinealositler içerisindeki triptofan, triptofan hidroksilaz ile 5-hidroksitriptofan'a hidroksillenmektedir. Triptofan hidroksilaz enzimi nörotransmitter olan serotonin üretim yolağının ilk enzimidir. Bu kısım yolağın hız kısıtlayıcı basamağıdır [165]. Oluşan bu reaksiyon pinealositler dışında sinir sistemi ve karaciğerde de gerçekleşir [166]. Triptofan hidroksilaz enzimi tetrahidrobiopterin (BH4) ve O₂'yi kofaktör olarak kullanır ve B₆ vitamini bu reaksiyonda koenzim olarak görev alır [165]. 5-hidroksitriptofan ise aromatik L-aminoasit dekarboksilaz (dopa dekarboksilaz) vasıtasıyla karboksil grubunu kaybederek 5-hidroksitriptamin'e (serotonin) dönüştürülür. 5-hidroksitriptofan'ın tersine 5-hidroksitriptamin kan-beyin bariyerini geçemez. Pineal bir enzim olan arilalkilamin N-asetiltransferaz (AANAT) ile serotonin N-asetilserotonin'e (NAS) ve son olarak N-asetilserotonin, diğer bir pineal enzim olan hidroksiindol-O-metiltransferaz (HIOMT) enzimi tarafından melatonin'e dönüştürülür [158, 159, 164]. Melatoninin sentezinde görev alan HIOMT enziminin pineal bez dışındaki organlarda bulunması nedeniyle, melatonin sentezinin pineal bez dışında da gerçekleştiği öne sürülmüştür [167].



Şekil 2.3 Melatonin sentez basamakları

Serotoninin gece saatlerinde azalması yani melatonine dönüşmesi nedeniyle melatonin sentezi artar [167]. Melatonin sentezlendikten sonra pinealositlerden 29 mg/gün hızla salgılanmaktadır[168]. Melatoninin sentezi ve salınmasını etkileyen birçok faktör vardır, ama bunların en önemlisi ışıktır. Işık melatonin sentezlenmesini baskılayan ana unsurdur. Göze gelen ışık, retinadaki fotoreseptörler aracılığıyla önce hipotalamustaki surprakiyazmatik nükleusa (SCN) sonra paraventriküler nükleusa (PVN) iletilir. PVN'deki sinirler aracılığıyla çıkan impulslar süperior servikal ganglionna ulaşır [167]. Bu gangliondan çıkan impulslar postganglionik sempatik sinirler aracılığıyla pineal beze ulaşır. Pineal bez içerisindeki norepinefrin, postganglionik sempatik sinir uçlarındaki en önemli transmitterdir. Işıқта SCN'ye aktarılan nöronal impulslar bu sinir uçlarından norepinefrin salınımını durdurur. Norepinefrin, pinealosit membranında yer alan postganglionik reseptörlere ($\beta 1$ ve $\alpha 1$ adrenerjik reseptörler) bağlanarak iş görür. Melatonin sentezinin yaklaşık %85'i $\beta 1$ reseptörlerinin uyarılmasıyla, %15'i $\alpha 1$ reseptörlerinin uyarılmasıyla gerçekleşir [163]. Uyarılan β -adrenerjik reseptörlerle hücre içinde önce adenilat siklaz aktive olur ve cAMP artar. Bu da hücre içerisindeki cAMP ve NAT enziminin artışına neden olur ve dolayısıyla melatonin sentezi artar. Tam tersi ışığa çıkıldığında, cAMP ve NAT seviyelerinde hızlı bir düşüş gözlenir. Ayrıca $\alpha 1$ reseptörler, pineal fonksiyonunun düzenlenmesinde $\beta 1$ reseptör uyarımını arttırmırlar[159, 164]. Yapılan hayvan deneylerinde karanlıkta NAT enziminin yükseldiği bunun bir sonucu olarak da melatonin kandaki miktarının arttığı gösterilmiştir. Tam tersi ışığa maruz kalındığında NAT enzim aktivitesinin ve kandaki melatonin seviyesinin hızla azaldığı gözlenmiştir [169].

2.5.2 Melatonin Reseptörleri

Melatonin, reseptörleri aracılığıyla hedef dokularda etki gösterir. Bu reseptörlerin hipofiz, retina, beyin başta olmak üzere tiroid bezi, timus, dalak, eritrosit, lökosit, plasenta, endometrium ve gastrointestinal sistemde bulunduğu bildirilmiştir [170-172]. Melatoninin ML1 ve ML2 olarak bilinen farklı farmakolojik ailelere ait membran bağımlı iki tip reseptörü tanımlanmıştır. Bu reseptörler insan ve memelilerde G proteinine bağlıdırlar. Ayrıca kuşlarda ML3 reseptörü de bulunmuştur [173]. ML1 reseptör geni insan kromozomunda 4q35.1 lokalizasyonunda kodlanmıştır. ML1 reseptörleri serebellum,SCN, hipokampus, serebral ve kaudal arterler, hipotalamus, preoptik alan, retinanın pleksiform tabakası, hipofizeal pars tuberaliste, talamus, ovaryum, böbrek ve ince barsaklar, testisler, deri, karaciğer, plasenta, meme, pankreas

ve dalakta bulunmuştur [174, 175]. ML1 reseptörleri uyku, sirkadiyen ritim, üreme, serebral arter kontraktilesi, renal fonksiyon, memeli retinasından dopamin salınması ve retinal fotopigment disklerinin fagositozudan sorumludur [176]. Adenilat siklazın ML1 reseptör aktivasyonu ile inhibisyonu sonucunda cAMP seviyesinde düşüş gözlenir. Fosfolipaz aktivasyonu aracılığıyla ML1 reseptörlerinin arşidonat salınmasını stimüle ettiği gösterilmiştir [176].

ML2 reseptör geni insan kromozomunda 11q21-22 bölgesinde kodlanmıştır. ML2 reseptörleri insan pitüiter bezi, beyin ve retinadan klonlanmış olup 363 aminoasit içermektedir [177]. Aynı zamanda ML2 reseptörü, ML1 reseptörü ile %60 oranında homoloji göstermektedir [178]. ML2 reseptörü, hipotalamus, SCN, immün sistem, retina, testisler, böbrek, sindirim kanalı, meme bezleri, deri ve adipöz dokuda bulunur [175, 177]. Pineal bezden melatonin hormonunun sirkadiyen salınmasıyla ML1 ve ML2 reseptörlerinin bağlantılı olduğu düşünülmektedir [179, 180]. ML1 reseptör aracılığıyla sirkadiyen ve reproduktif etkilerin gerçekleştiği; ML2 reseptörün ise beyinde ve retinada dopaminerjik fonksiyonlar ile ilişkili olduğu düşünülmektedir [181].

Melatonin sentezlendikten sonra depolanmaz. Lipofilik ve hidrofilik özelliğinden dolayı, ayrıca molekül ağırlığının düşük olması nedeniyle, pinealositlerden pasif difüzyonla hızlı bir biçimde atılır [164]. Bu özelliği nedeniyle melatoninin pineal bezde oluşan miktarı ile plazmadaki seviyesi arasında güçlü bir korelasyondan söz edilebilir [163]. Kandaki melatoninin yaklaşık %70'i plazma albüminine bağlıdır. Dolaşım ile tüm vücuda dağılan melatonin; kan, beyin omurilik sıvısı, idrar, tükürük, lenf, amniyotik sıvı, sperma, retina, siyatik sinirde ölçülmüş, plasenta ve anne sütünde saptanmıştır [159, 164]. Sonuç olarak pineal bezde melatonin sentezi arttığı anda kandaki titreleri de yükselir. Melatonin miktarının %60-70'i kanda albümine bağlı olarak dolaşır [182]. İnsanda jelatin kapsüller ve tablet şeklinde alınan melatonin yaklaşık 60 dakikada en yüksek plazma seviyesine ulaşır ve yarılanma süresi 3-45 dakika kadardır [182]. Başlıca karaciğerde ve ikincil olarak da böbreklerde metabolize olur [164]. Karaciğerden ilk geçişte melatoninin %90'ı metabolize olur ve mikrozomal enzimler tarafından 6-hidroksimelatoninine dönüşür. 6-hidroksimelatonin, %50-80'ni sülfat ve %5-30'u glukuronik aside bağlanır ve idrarla atılır [164]. Melatoninin idrardaki başlıca metaboliti, 6-sulfatoksi-melatonin'dir [159]. Bu metabolit, melatonin konsantrasyonu ile yakın ilişkilidir. Melatoninin ortalama %1'lik kısmı ise değişmeden atılır [167].

Yaşam boyunca genetik olarak melatonin sirkadiyen ritmi belirlendiğinden her bireyin salınım siklusu sabittir. Ancak kandaki melatonin konsantrasyonunda yaşa bağlı

olarak değişimler görülür. Yeni doğanlarda kan melatonin konsantrasyonu düşük olup, melatonin ritmi hayatın 6-8. haftasında ortaya çıkmaktadır [183]. Kandaki maksimum melatonin seviyesi 8 yaş civarında görülürken, pubertal dönemde belirgin bir azalma gözlenir. İlerleyen yaşla birlikte melatonin seviyesinde sürekli bir azalma gözlenir [184]. İnsanda plazmadaki melatonin düzeyleri de 24 saatlik zaman dilimi içinde düzenli iniş çıkışlar gösterir. Bu ritmin ana faktörü dışarıdaki aydınlık/karanlık siklus olup ritim SCN'deki santral pacemaker'lar tarafından kontrol edilir. Eğer gece ışığa maruz kalınırsa pineal fonksiyonlar akut olarak baskılanıp, melatonin salınımı azalır [185]. Melatonin düzeyi gece 20.00-23.00 arasında yükselmeye başlar, 01.00-05.00 arasında en yüksek seviyede iken, sabah 05.00-07.00 arasında azalmaya başlar ve 07.00'den sonra bazal seviyelere düşer. Plazma melatonin düzeyi gündüz 0-20 pg/ml, gece 50-200 pg/ml (ortalama 60-70 pg/ml) dir [161]. Bunun yanında hem gün ışığının hem de belirli şiddetteki yapay ışığın melatonin salınmasını baskıladığı bilinmektedir [28].

2.5.3 Melatoninin Biyolojik Etkileri

Melatonin uyku, sirkadiyen ritim, duygu durumu, termoregülasyon, cinsel olgunlaşma, kardiyovasküler sistem ve üreme gibi birçok biyolojik olayla ilişkili olduğu bildirilmiştir [186]. Ayrıca, yapılan çalışmalarda melatoninin anti-oksidan, anti-enflamatuvar, anti-viral, anti-mikotik, kemik yapımını ve immüniteyi düzenleyici, kanser ve yaşlanmanın önlenmesinde de etkili olabileceği gösterilmiştir [27, 182, 187, 188].

2.5.3.1 Antioksidan Etkisi

Melatonin, güçlü bir oksijen radikal toplayıcısı olarak dokuların hasara uğramasını geciktirebilir [189]. Hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil (OH^-), süperoksit anyonu (O_2^-), nitrik oksit (NO^-) ve peroksinitrit ($ONOO^-$) gibi oksidatif strese yol açabilen serbest radikaller melatonin tarafından detoksifiye edilebilir ve dolayısıyla biyomoleküller üzerindeki zararlı etkileri önlenmektedir. Melatoninin serbest radikaller üzerine dolaylı etkileri de vardır. Bazı antioksidan enzimlerin (glukoz dehidrogenaz, g-glutamilsistein sentetaz gibi) gen ekspresyonları veya aktiviteleri melatonin tarafından arttırılarak, oksidatif stresin baskılandığı bildirilmiştir [190, 191]. Ayrıca melatoninin nitrik oksit ve peroksinitritin oluşumuna neden olan nitrik oksit sentaz (NOS) aktivitesini inhibe ettiği rapor edilmiştir [191, 192].

Yaşlanma sürecinde antioksidan kapasitesinin azalması ve serbest radikallerin oluşturduğu hasar nedeniyle organlarda anatomik ve işlevsel dejenerasyon oluşur. Pinealosit membranı üzerinde bulunan β -adrenerjik reseptör sayısı yaşlanmayla beraber azaldığından, pineal bezdeki melatonin sentezinin azalmasına neden olur. Böylece melatonin serbest radikalleri ortadan kaldıramayarak oksidatif hasara neden olur [182]. Melatoninin bu özelliklerinden dolayı yaşla ilişkili hastalıklarda (Alzheimer, Parkinson, diabetes mellitus ve romatoid artrit) geniş uygulama alanları bulunmuştur [29]. Yüksek lipofilik özelliği en önemli avantajı olup herhangi bir bağlanma bölgesine ve reseptöre ihtiyaç duymaz [189].

2.5.3.2 İmmünite Üzerine Etkisi

Melatonin T-yardımcı lenfositlerdeki spesifik reseptörlere bağlanarak immün fonksiyonu arttırıcı etki göstermektedir. Bu reseptörlere bağlanmasıyla IFN- γ , IL-2 veya opioid peptidlerin salgılanması artmaktadır. Bu artış sonucunda CD4⁺ lenfositleri aktive olur. Melatonin sentezi engellendiğinde humoral ve hücrel immün reaksiyonlarda azalma gözlenirken, melatonin verilmesiyle immün fonksiyon yeniden uyarılmaktadır [158].

2.5.3.3 Uyku Üzerine Etkisi

Gece boyunca melatoninin düşük seviyede salgılanması uykunun azalmasına ve neticesinde uykuya duyulan ihtiyacın artmasına neden olur. Eğer sekresyon gece devam etmezse gece uyanmaları görülür. Fazla miktarda ve uzun süre melatonin salgılandığı sürece daha az uyarı algılanmaya başlanır ve uyku isteği devam eder [28].

Bunun yanında melatoninin esas görevlerinden bir diğeri “jet lag” (eş zamanlama bozukluğu) olarak da bilinen biyolojik saatin korunması ve ritminin ayarlanması olup bu görevi yapan tek hormondur. Melatoninin yeterli ve düzenli salgılanmaması sonucu jet lag belirtileri gözlenir (yorgunluk hissi, uykusuzluk, huzursuzluk, iştahsızlık, zaman algısında bozulma, zihinsel problemler, olaylara geç tepki verme, yönelim bozukluğu, nedensiz yaygın vücut ağrıları, hazımsızlık, terleme gibi).

2.5.3.4 Duygu Durumuna Etkisi

Depresif semptomlar kısa günler boyunca devam eder ve günler uzadıkça semptomların şiddeti azalır. Genellikle kuzey enlemlerinde yaşayan insanlarda bu semptomların görülme olasılığı daha yüksektir [193]. Yaz ile kış aylarındaki gün ışığı periyodu ve

gece melatonin salınım süresindeki farklılıklar, depresyona yatkın kişilerde atağın gelişmesine sebep olmaktadır [194]. Kış aylarında güneş ışığına daha az maruz kalınması sirkadiyen ritimde gecikmeye ve uyku uyanıklık döngüsü arasındaki dengenin sağlanamamasına yol açtığı düşünülmektedir [194].

2.5.3.5 Cinsel Olgunlaşmaya Etkisi

Over ve testislerin olgunlaşması hipofiz bezinden salınan folikül uyarıcı hormon ve lüteinleştirici hormon ile uyarılır ve böylece pubertal dönem tetiklenir [195]. Melatoninin yüksek dozda kullanılmasıyla menstruel döngü sırasında lüteinleştirici hormonun zirve yapmasını engellediği ve folikül uyarıcı hormon seviyesinin sabit kalmasına neden olduğu bildirilmiştir. Aynı şekilde melatonin ovulasyonda ve luteal fazda progesteron miktarındaki artışı engellemektedir [196].

2.5.3.6 Kanser Üzerine Etkisi

Melatoninin kanserli dokularda hücre proliferasyonunu durdurduğu, mitotik aktiviteyi engellediği, metastaz sayısını azalttığı ve meme dokusunda anti-östrojen etki gösterdiği saptanmıştır [163]. Yapılan gözlemlerde prostat ve meme kanseri olan hastalarda melatonin seviyesi düşük bulunmuştur [163, 169].

Melatoninin kanser hücrelerinin artışı ve kanser oluşumunu engellediği, hücre yenilenmesini sağladığı, immün sistemi güçlendirdiği ve yaşlanmayı geciktirdiği düşünüldüğünde, melatoninin apoptozu (hücrelerin programlı ölümü) uyaran hormonlardan biri olma olasılığı vardır [32]. Yapılan bir çalışmada tümör oluşturulan farelere melatonin uygulanması sonrası melatoninin kan hücrelerini kemoterapötik ilaçların toksik etkilerinden koruduğu gösterilmiştir [197].

2.5.3.7 Termoregülasyona Etkisi

Melatoninin vücutta ısı kaybına, merkezi vücut ısısını azaltıp, periferik cilt ısısını artırarak yol açmaktadır [163]. Isı merkezi hipotalamusun ön bölümündeki preoptik sahadadır. Yapılan araştırmalarda bu merkezdeki nöronlarda melatonin reseptörleri bulunduğu ve melatoninin bu merkezleri etkileyerek vücut ısısında düşmeye neden olduğu saptanmıştır [164]. Ayrıca düşük doz melatoninin ratlarda hipertermik, yüksek dozun ise hipotermik etkili olduğu bulunmuştur [198].

2.5.3.8 Kardiyovasküler Sisteme Etkisi

Melatonin, serebral arterlerde vazokonstriksiyona; periferel damar yataklarında ise vazodilatasyona neden olmaktadır. Bu konu üzerine in vivo olarak yapılan bir çalışmada, intravenöz melatonin uygulamasının ventriküler taşikardiyi, ventriküler fibrilasyonu ve premature ventriküler kontraksiyonu engellediği saptanmıştır [199]. Diğer bir çalışmada ani ölüm ve miyokard infarktüs riski olan koroner kalp hastalarında melatonin düzeyleri düşük bulunmuştur [200].

2.5.3.9 Anti-enflamatuvar Etkisi

Melatoninin serbest radikaller üzerindeki süpürücü etkisi onun aynı zamanda güçlü bir anti-enflamatuvar ajan olduğunu da açıklamaktadır. Enflamasyonun başlamasıyla melatonin bu yolaktaki çeşitli basamaklarda blokaj sağlayarak anti-enflamatuvar ve doku koruyucu etki gösterir [201]. Deneysel ve klinik veriler melatoninin adezyon moleküllerini ve pro-enflamatuvar sitokinleri (IL-6, IL-8, TNF- α ve modifiye serum enflamatuvar parametreleri) azalttığını göstermiştir [202]. Melatoninin birçok ek anti-enflamatuvar etkisi olup bu durum melatoninin lenfositlerde ve makrofajlarda spesifik bağlanma bölgeleriyle direk etkileşimiyle ilişkili olabilir. Yapılan son çalışmalarda melatoninin COX-1 ve COX-2'nin aktif bölgelerine bağlanarak enflamatuvar enzim COX-2'yi inhibe ettiği gösterilmiştir [188, 203]. Yanık, sepsis, iskemi gibi enflamasyon durumlarında melatoninin nötrofil kaynaklı oksidan yıkımı geri çevirdiği saptanmıştır [204].

2.5.3.10 Kemik Üzerine Etkisi

Melatoninin kalsiyum metabolizması üzerine etkisi ilk olarak Csaba ve arkadaşları [205] tarafından çalışılmıştır. Bu etkiyi paratiroid ve kalsitonin hormon salınımını etkileyerek aracılık ettiği ileri sürülmüştür [205]. Melatonin sekresyonunun baskılanması sonucunda serum kalsiyum konsantrasyonu düşerken, tam tersi melatonin sekresyonu olduğunda bu konsantrasyonun arttığı saptanmıştır. Melatonin direk kemik üzerine etkisini osteoblastların proliferasyonunu ve osteoblastlardan osteoprotegerin ekspresyonunu arttırıp RANK'ın osteoprotegerin ile bağlanmasını sağlayarak, bunun yanında osteoklast farklılaşma faktörünün inhibisyonu için gen eksprese ederek ve serbest radikalleri ortadan kaldırma özelliğiyle kemik üzerindeki osteoklast aktivitesini bozarak gösterir [33]. Yapılan birçok çalışmada melatoninin kemik formasyonunda ve stimülasyonunda önemli bir aracı madde olduğu, kemik hücrelerinin ve osteoblastik

hücrelerin proliferasyonunu artırıp bu hücrelerle prokollajen tip 1 c-peptidinin üretimini arttırdığı gösterilmiştir [35, 37]. Aynı zamanda melatonin sialoprotein ve diğer kemik protein belirteçlerinin (alkalin fosfataz, osteokalsin) gen ekspresyonlarını teşvik eder [187]. Ovariectomili sıçanlarda yapılan bir çalışmada melatonin uygulandıktan sonra kemik kaybının azaldığı saptanmıştır [206].

Literatürde periodontal hastalık ile melatonin ilişkisini ve etkinliğini araştıran çalışma sayısı sınırlıdır. Almughrabi ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada periodontal olarak sağlıklı, gingivitisli, kronik periodontitisi ve agresif periodontitisi olan kişilerde tükürük ve dişeti oluğu sıvısında melatonin seviyeleri araştırılmıştır. Melatonin seviyesinin hastalıklı periodontal dokularda özellikle periodontitiste düşük olduğu tespit edilmiş ve en düşük melatonin seviyesi agresif periodontitisi olan kişilerde gözlenmiştir[34].

Bertl ve arkadaşlarının yaptıkları başka bir çalışmada ise 30 periodontal olarak sağlıklı ve 30 generalize periodontitis hastasının tükürük ve serum melatonin seviyeleri ve serum C-reaktif protein seviyesi değerlendirilmiştir. Periodontal tedavi sonrasında enflamasyonun azalmasıyla birlikte tükürük melatonin seviyesinin yükselmesini ilişkili bulmuşlardır. Bu sonuçlar doğrultusunda, periodontal hastalıkta tükürük melatonin seviyesinin bir risk indikatörü olabileceğini öne sürmüşlerdir[207].

2.5.4 Melatoninin Terapötik Dozları ve Yan Etkileri

Düşük dozlarda melatoninin yararlı antioksidan etkileri romatoit artritli kişilerde, primer hipertansiyonu ve tip 2 diyabeti olan yaşlı kişilerde (5mg/gün) gözlenmiştir [208-210]. Yapılan bir çalışmada yüksek dozda melatoninin (20mg/kg) sıtma sonucu oluşan oksidatif stres kaynaklı karaciğer yıkımını ve apoptozisi inhibe ederek yararlı etki gösterdiği rapor edilmiştir [211].

Hayvan çalışmalarında yüksek dozlarda melatonin kullanımının (yetişkin bir insan için yaklaşık 30mg) retinal fotoreseptörlerde ışığın indüklediği yıkımı arttırdığı gösterilmiştir [212]. 1-5 mg melatonin oral yolla alınması 1 saat sonra serum seviyesini gece ulaşılan plazma düzeyinin 10-100 katına çıkarır ve bu seviye 4-8 saat içinde düşer[213]. Bunun yanında düşük doz melatonin (0.1-0.3 mg) gündüz alındığında gece ulaşılan melatonin pik konsantrasyonunu verebilir yani melatonin biyoyararlanım açısından farklılık göstermekte olup biyoyararlanımı %3 ile %76 arasında değişmektedir.

Endokrin sistemdeki belirgin etkilerine rağmen melatoninin yüksek farmakolojik dozları serumda lüteinleştirici hormon seviyesini artırabilir ve prolaktin seviyesinde düşme yapabilir[213].Diğer antioksidanların aksine, çok yüksek dozlarda (300 mg/gün) ve 5 yıl gibi uzun süre kullanımda bile, melatonin toksik bir etki göstermemiştir [214]. Ancak yüksek dozda melatoninin prooksidan davranışı ile ilgili yayın mevcuttur [168].

Literatürde periodontitis-melatonin ve osteoporoz-melatonin ilişkisini araştıran çalışmalar bulunmaktadır. Çalışmamız ise osteoporoz, periodontitis ve melatonin ilişkisinin birlikte ele alındığı ilk çalışmadır. Bu bilgilerin ışığında çalışmamızın amacı sistemik olarak verilen melatoninin osteoporotik ratlarda oluşturulan deneysel periodontitis modelinde alveoler kemik kaybı üzerine etkisinin biyokimyasal, morfolometrik ve immünohistokimyasal açıdan araştırmaktır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Cumhuriyet Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından bu araştırma için 31.05.2013 tarih ve 377 sayılı karar ile onay alındı. Denek olarak 12 haftalık, ortalama ağırlıkları 220-250 gr olan 44 adet dişi Wistar rat kullanıldı. Deney hayvanlarının seçiminde genel sağlıklarının iyi olması, önceden üzerinde herhangi bir çalışma yapılmamış olması ve dental/periodontal yönden sağlıklı olmaları gibi şartlara özen gösterildi. Ayrılan ratlar $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ve %40-60 nem oranı standardını sağlayacak şekilde ayarlanmış ortamda ayrı tip 3 kafeslerde tutuldu. Çalışmanın deneysel aşamaları Cumhuriyet üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Laboratuvarında gerçekleştirildi.

Hayvanlarda deneysel işlemler için sağ mandibuler molar dişler seçildi.

Çalışma grupları;

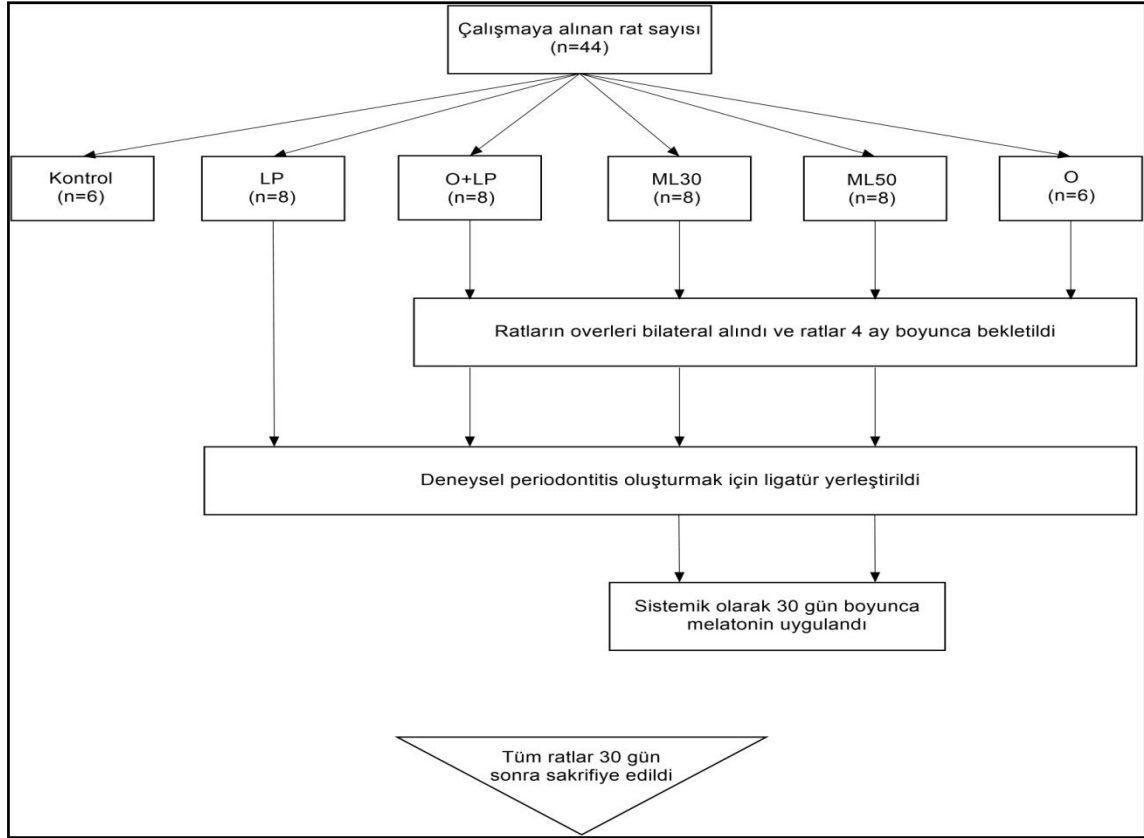
1. Kontrol grubu (K, n=6 rat)
2. Deneysel osteoporoz grubu (O, n=6 rat)
3. Deneysel periodontitis grubu (LP, n=8 rat)
4. Deneysel osteoporoz ve deneysel periodontitis grubu (O+LP, n=8 rat)
5. Deneysel osteoporoz, deneysel periodontitis ve 30 mg/kg-gün melatonin grubu (ML30, n=8 rat)
6. Deneysel osteoporoz, deneysel periodontitis ve 50 mg/kg-gün melatonin grubu (ML50, n=8 rat)

3.1 Deneysel Osteoporoz Oluşturulması

Deneysel osteoporozu oluşturmak için anestezi altında (Ketamin 30 mg/kg IM ve Rompun 5mg/kg IM) 30 ratın overleri bilateral olarak alınmıştır. Operasyon sonrasında ratlar 4 ay bekletilip rastgele olacak şekilde 4 grubu ayrıldı.

3.2 Deneysel Periodontitis Oluşturulması

Ratların sağ mandibuler birinci molar dişlerine anestezi altında (Ketamin 30mg/kg IM ve Rompun 5mg/kg IM) 4/0 ipek sütür (Çetin Kimya, Adana, Türkiye) subgingival olarak yerleştirilip bu bölgede plak retansiyonu sağlanarak deneysel periodontitis oluşturuldu. Süturlar bir ay boyunca haftalık olarak kontrol edildi.



Şekil 3.1 Çalışma dizaynı şeması

3.3 Melatonin Uygulanması

Osteoporoz oluşturulduktan sonra ligatür yerleştirilen 8 rata kiloları göz önünde bulundurularak günlük 30 mg/kg, diğer 8 rata ise 50mg/kg melatonin çözeltisi günde 0.5 cc olacak şekilde 30 gün boyunca sabah saat 10:00-11:00 arasında intraperitoneal olarak verildi.

3.4 Sakrifikasyon

Çalışma dizaynı Şekil 3.1’de gösterilen şekilde yapıldı ve 30. günün sonunda tüm ratlardan kardiyak ponksiyon ile 4 cc kan alınarak jelli tüplere (Vacutest Kima, Arzergrande, İtalya) konuldu. Daha sonra 200 mg/kg intraperitoneal olarak verilen pentotal sodyum (Ekipental, Tümekep İlaç Sanayi, İstanbul, Türkiye) enjeksiyonu ile sakrifiye edildi. Çıkarılan mandibulaların fiksasyonu için %10’luk formaldehit solüsyonuna konuldu.

3.5 Ratlardan Serum Elde Edilmesi

Ratlardan alınan kan örnekleri 10 dakika boyunca (3000 devir/dakika) santrifüj (NF-1000 R, Nüve, İstanbul, Türkiye) edildi. Elde edilen örnekler serum ve plazma olarak ayrıldıktan sonra serum kısmı eppendorf tüplerine konularak ELİZA analizi yapılacağı güne kadar -80°C’de saklandı.

3.6 IL-6 ELİZA Prosedürü

Rat IL-6 ELİZA kiti (Invitrogen, Camarillo, Kaliforniya, ABD) üretici firmanın talimatları doğrultusunda uygulandı. Deney prosedürü aşamasında standart solüsyonu standart şişesi üzerinde yazan miktar doğrultusunda Standart Dilüent Buffer kullanılarak sulandırıldı. Sıfır standart için Standart Dilüent Buffer kullanıldı. Kromojen Blank kuyucuğu boş bırakıldı. Kromojen hariç kuyucuklara 100µl standart solüsyon konuldu. Diğer kuyucuklara 50µl standart diluent buffer ve çalışılacak örneklerden 50µl ilave edildi. Tüm kuyucuklara 50 µl inkübasyon buffer eklendi. Sırasıyla 100 µl biotinylated Rat IL-6 Biotin Konjugat ve 100 µl Streptavidin-HRP Çalışma Solüsyonu ile inkübe edildi. Tüm kuyucuklara 100µl kromojen solüsyonu konularak inkübe edildi. Son olarak 100µl stop solüsyonu eklendi ve 450 nm dalga boyunda okundu. Standart konsantrasyonları ve bu konsantrasyonlara ait absorbans değerleri ile standart eğri oluşturuldu. Bu eğri kullanılarak IL-6 seviyeleri hesaplandı. Alınan değerler dilüsyon oranları ile çarpılarak gerçek konsantrasyonlara ulaşıldı. Kitin duyarlılığı <5 pg/ml olup bu değerlerin altındaki okumalar 0 pg/ml olarak kaydedildi.

3.7 Morfometrik Değerlendirme

Histopatolojik işlemlerden önce alveoler kemik kaybının miktarı için her dişin altı farklı bölgesinden (mezyo-bukkal, mid-bukkal, disto-bukkal, mezyo-lingual, mid-lingual, disto-lingual) mine-sement sınırı ile alveoler kret tepesinin arasındaki mesafe ölçülerek belirlendi. Mandibulalar ilk önce metilen mavisine batırılarak stereomikroskop (Stemi DV4, Carl Zeiss, Jena, Almanya) altında 12x büyütmede mikroskoba uyumlu bir fotoğraf makinesi (Eos 1000, Canon, Tokyo, Japonya) ile fotoğraflandı. Histomorfometrik ölçümler çekilen fotoğraflar üzerinden bir görüntü analiz programı (Clemex Vision Lite, Quebec, Kanada) ile yapıldı. Her dişte ölçülen sayısal değerlerin toplamının ortalaması milimetre cinsinden kaydedildi.

3.8 Histopatolojik İşlemler

Elde edilen mandibula örnekleri histopatolojik analizler için 24 saat boyunca %10'luk formaldehitte tespit edildikten sonra %10'luk EDTA ile dekalsifiye edildi. Dekalsifikasyon sonrası örnekler mezyo-distal yönde 1. molar dişin tam ortasından olacak şekilde bistüri yardımıyla ikiye ayrıldı. Distile su ile yıkanan örnekler derecesi giderek artan alkol serileri ile dehidrasyonu takiben, ksilen ile şeffaflaştırma işlemi uygulanarak parafine gömüldü. Parafin bloklardan alınan 5µm kalınlığındaki seri kesitler histopatolojik değerlendirme için 1 gece 60°C'de etüvde bekletildi. Ksilende deparafinize edildikten sonra rehidratasyon işlemi uygulanarak Hematoksilen-Eozin (HE) ile boyandı. Boyanan kesitler ışık mikroskobu (Eclipse 80i, Nikon, Tokyo, Japonya) altında farklı büyütme oranlarında değerlendirildi.

Boyanan kesitlerde enflamatuvar hücre infiltrasyonu, alveoler kemik ve interdental septumdaki osteoklast ve osteoblast sayıları incelendi. Enflamatuvar hücre infiltratı semi-kantitatif bir değerlendirme [215] ile gözle görülebilir, infiltrat hücre 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 3µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler tam otomatik slayt hazırlama sistemi cihazında (Ventana Benchmark XT, Roche, Tuscon, ABD) 32 dakika boyunca antikör (anti-RANKL antikoru, 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 boyunca 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 tespit edildi 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 [216].

3.9 İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmamızın verileri SPSS (Ver:14.0) programına yüklenerek istatistiksel analiz yapıldı. Verilerimizin dağılımı normal olmadığından istatistiksel analizler için non-

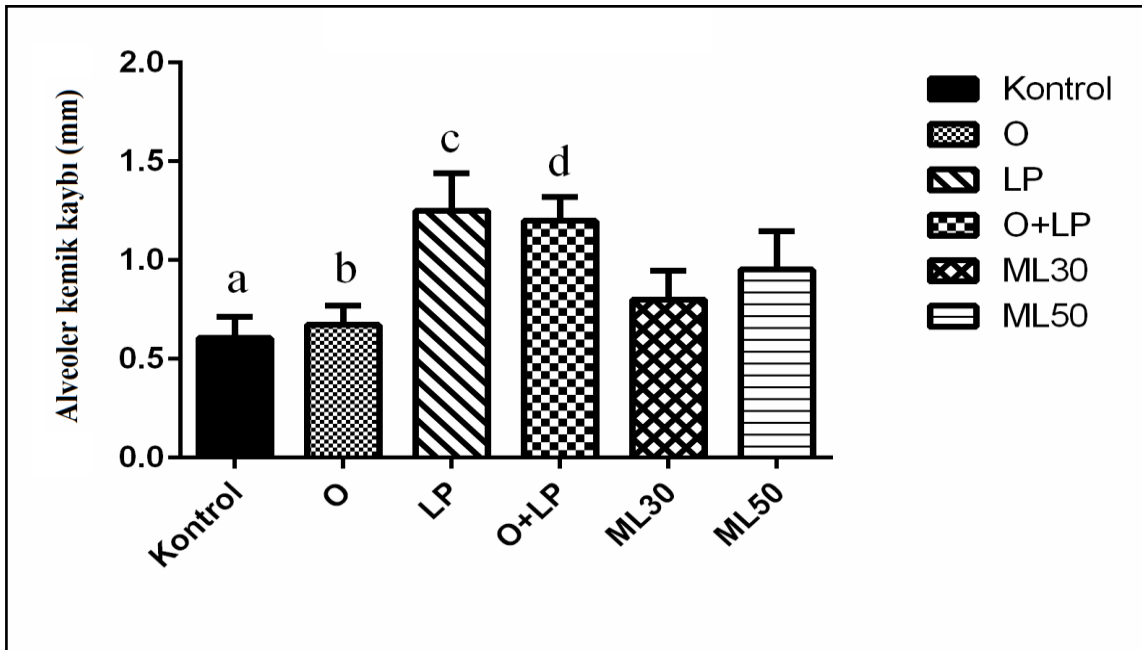
parametrik testlerden Kruskal-Wallis kullanıldı. Analiz sonucunda anlamlılık bulunan parametrelerde grupların ikili karşılaştırılması için Mann-Whitney U testi uygulandı. Verilerimiz aritmetik ortalama, standart sapma, minimum-maksimum ortanca değerleri ve yüzde olarak belirtilip yanılma düzeyi 0.05 olarak alındı.

4. BULGULAR

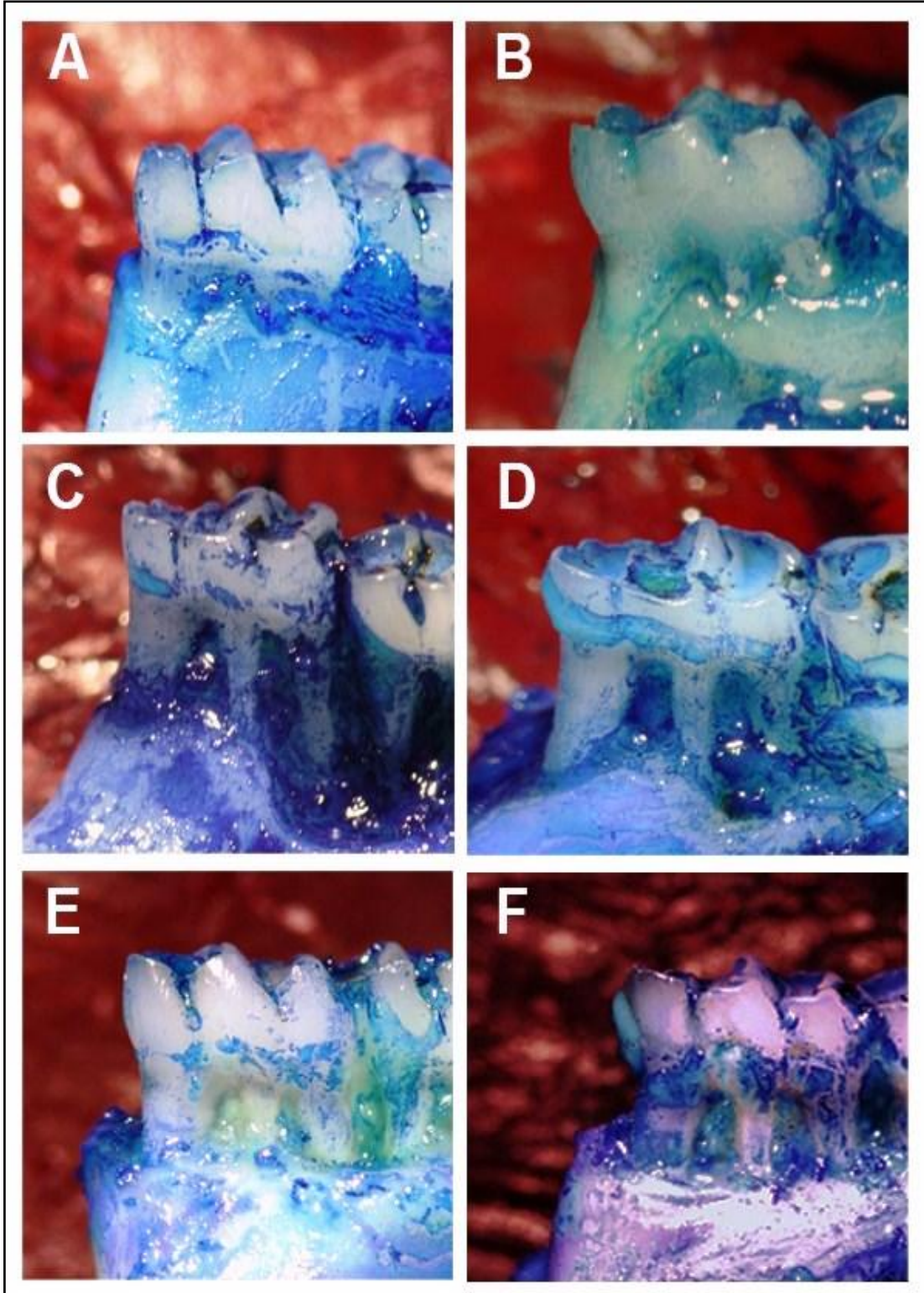
Deney süresince yerleştirilen ligatürlerde kopma ya da ayrılma gözlenmedi. Deney süresince ratlarda herhangi bir olumsuz etki saptanmadı.

4.1. Morfometrik Ölçümler

Gruplara ait alveoler kemik kaybı ölçümleri karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edildi ($p<0.05$) (Şekil 4.1). Gruplara ait ölçümler ikişerli olarak karşılaştırıldığında; Kontrol ve O grubundaki alveoler kemik kaybı LP, O+LP, ML50 gruplarına oranla anlamlı düzeyde düşüktü ($p<0.05$). Bununla beraber kontrol ve O grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık saptanmadı. LP ve O+LP gruplarında ML30 ve ML50 gruplarına göre daha fazla alveoler kemik kaybı tespit edildi ($p<0.05$). ML30 ve ML50 grupları arasında alveoler kemik kaybı açısından anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Ayrıca K ve O grupları ile ML30 grubu arasında alveoler kemik kaybı benzerdi (Şekil 4.2).



Şekil 4.1 Gruplara ait alveoler kemik kaybı ortalamaları ^a $p<0.05$ LP, O+LP ve ML50 gruplarından farklı; ^b $p<0.05$ LP, O+LP ve ML50 gruplarından farklı; ^c $p<0.05$ ML30 ve ML50 gruplarından farklı; ^d $P<0.05$ ML30 ve ML50 gruplarından farklı

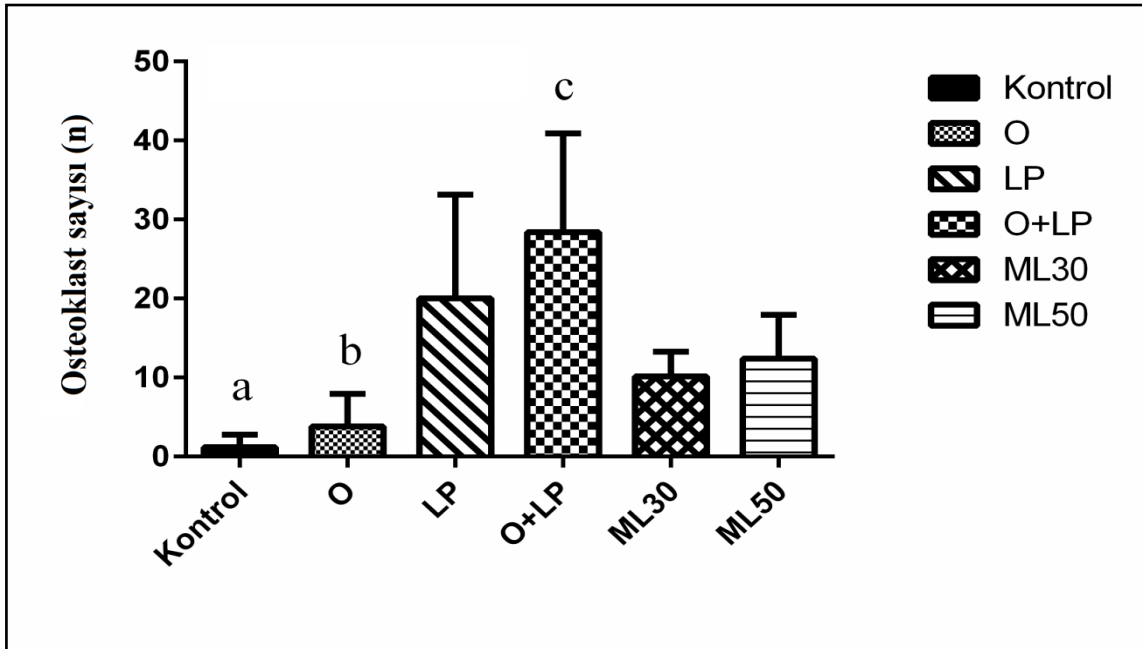


Şekil 4.2 Gruplara ait alt sağ 1. molar dişlerin stereomikroskop görüntüsü (12x). A: K grubu, B: O grubu, C: LP grubu, D: O+LP grubu, E: ML30 grubu, F: ML50 grubu

4.2. Histopatolojik Değerlendirme

Osteoklastik aktivite

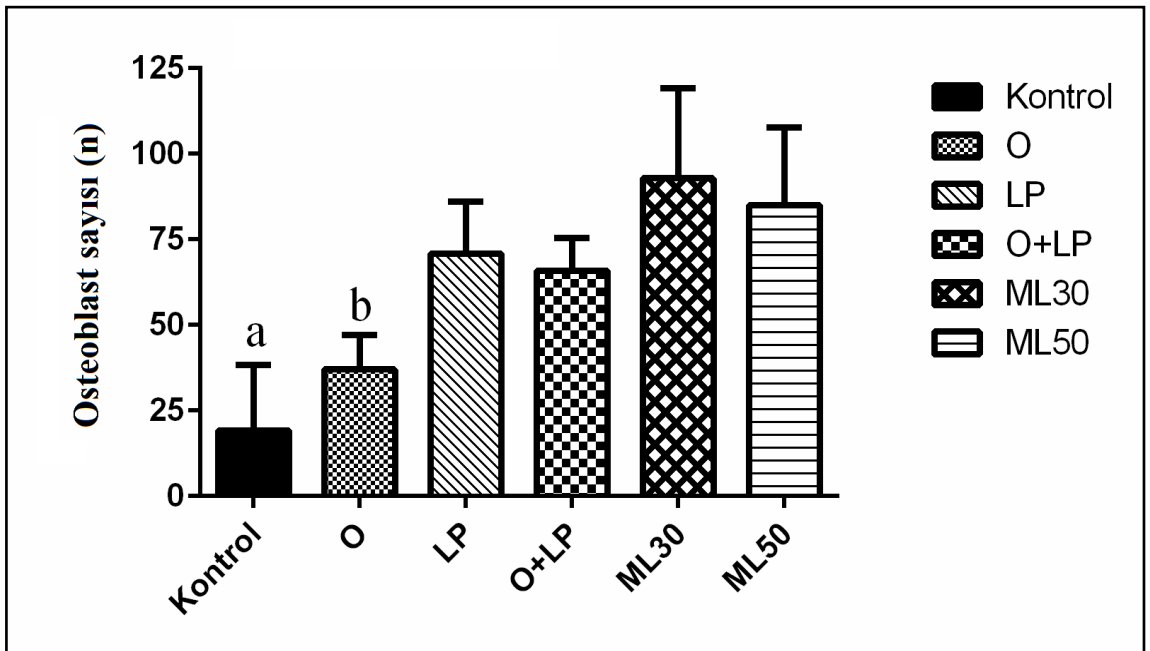
Gruplara ait osteoklast sayısı ortalamaları Şekil 4.3'te sunulmuştur. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre Kontrol ve O gruplarındaki osteoklast sayısı LP ve O+LP gruplarıyla karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde daha azdı ($p<0.05$) (Şekil 4.6-A, B) ve en yüksek osteoklast sayısı O+LP grubunda saptandı. Melatonin uygulanan gruplarla K ve O grupları arasında osteoklast sayısı açısından anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0.05$). Histolojik kesitlerde LP ve O+LP gruplarında osteoklastlar, Howship lakünleri denilen, rezorbe edilmiş ya da enzimatik olarak aşındırılmış sığ çukurlar içinde yerleşmiş bir şekilde kemik yüzeyi boyunca gözlemlendi. (Şekil 4.6-C, D)



Şekil 4.3 Gruplara ait osteoklast sayısı dağılımı ^a $p<0.05$ LP ve O+LP gruplarından farklı; ^b $p<0.05$ LP ve O gruplarından farklı; ^c $p<0.05$ ML30 ve ML50 gruplarından farklı

Osteoblastik aktivite

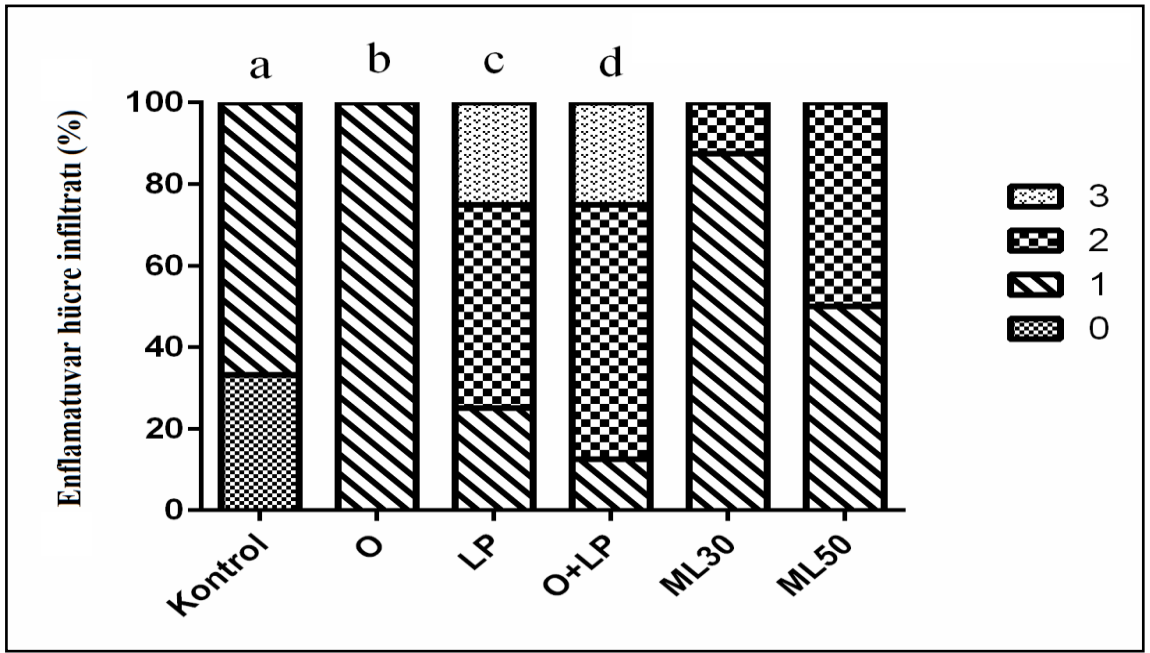
Gruplara ait osteoblast sayıları karşılaştırıldığında gruplar arası farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$) (Şekil 4.4). Osteoblastik aktivite en düşük Kontrol grubunda gözlenirken, en yüksek ML30 ve ML50 gruplarında saptandı. Kontrol grubu ile O grubu arasında osteoblastik aktivite düzeyi benzer iken, LP, O+LP, ML30 ve ML50 grupları arasında osteoblast sayısı bakımından anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($p>0.05$). Histolojik kesitlerde özellikle ML30 ve ML50 gruplarında osteoblastlar, kemik matriksinde aktif olarak birikmiş olup kemik trabekülleri boyunca çizgisel bir düzende yoğun şekilde izlendi (Şekil 4.6-E, F).



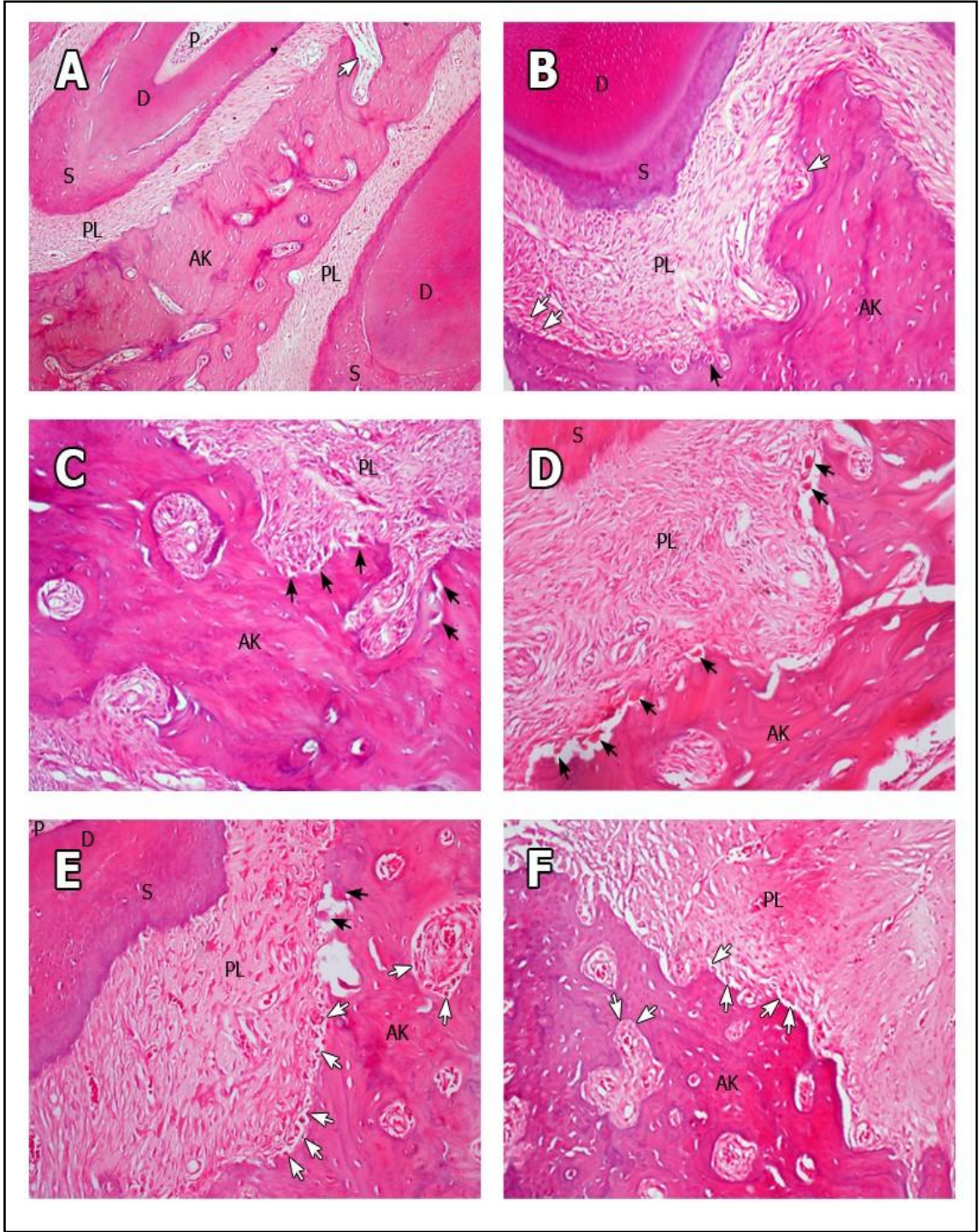
Şekil 4.4 Gruplara ait osteoblast sayısı dağılımı (n) ^a $p<0.05$ LP, O+LP, ML30 ve ML50 gruplarından farklı; ^b $p<0.05$ LP, ML30 ve ML50 gruplarından farklı

Enflamatuvar hücre infiltratı

Gruplara ait enflamatuvar hücre infiltratı değerleri karşılaştırıldığında gruplar arasındaki farklılık anlamlı bulundu ($p<0.05$) (Şekil 4.5). Enflamatuvar hücre infiltratı en düşük Kontrol grubunda gözlenirken, LP ve O+LP gruplarında en yüksek düzeyde saptandı. K ve O gruplarının enflamatuvar hücre infiltratı yüzdeleri benzerdi. LP ve O+LP gruplarında enflamatuvar hücre infiltratı ML30 grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde daha yüksek bulundu ($p<0.05$). ML30 ve ML50 grupları arasında enflamatuvar hücre infiltratı bakımından anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p>0.05$).



Şekil 4.5 Gruplara ait enflamatuvar hücre infiltratı dağılımı (%) ^a $p<0.05$ LP, O+LP ve ML50 gruplarından farklı; ^b $p<0.05$ LP ve O+LP gruplarından farklı; ^c $p<0.05$ ML30 grubundan farklı; ^d $p<0.05$ ML30 grubundan farklı



Şekil 4.6 Gruplara ait histolojik kesitler

A: Kontrol grubuna ait bir örnekte pulpa, dentin, sement, periodontal ligament ve alveoler kemik ilişkisi görülmektedir. Osteoklastik aktivite gözlenmezken, beyaz okla gösterilen bölgede az sayıda osteoblast görülmektedir (100x).

B: O grubuna ait örnekte osteoblastik hücrelerin (beyaz ok) yanında osteoklastik aktivitede (siyah ok) görülmektedir (200x).

C: LP grubunda çok az osteoblastik hücrelerin yanında yoğun osteoklastik aktivite mevcuttur (200x).

D: O+LP grubunda yoğun bir şekilde osteoklastik aktivite (siyah ok) görülmektedir (200x).

E: ML30 grubunda az sayıda osteoklast (siyah ok) yanında artmış yoğun osteoblastik aktivite (beyaz ok) gözlenmektedir (200x).

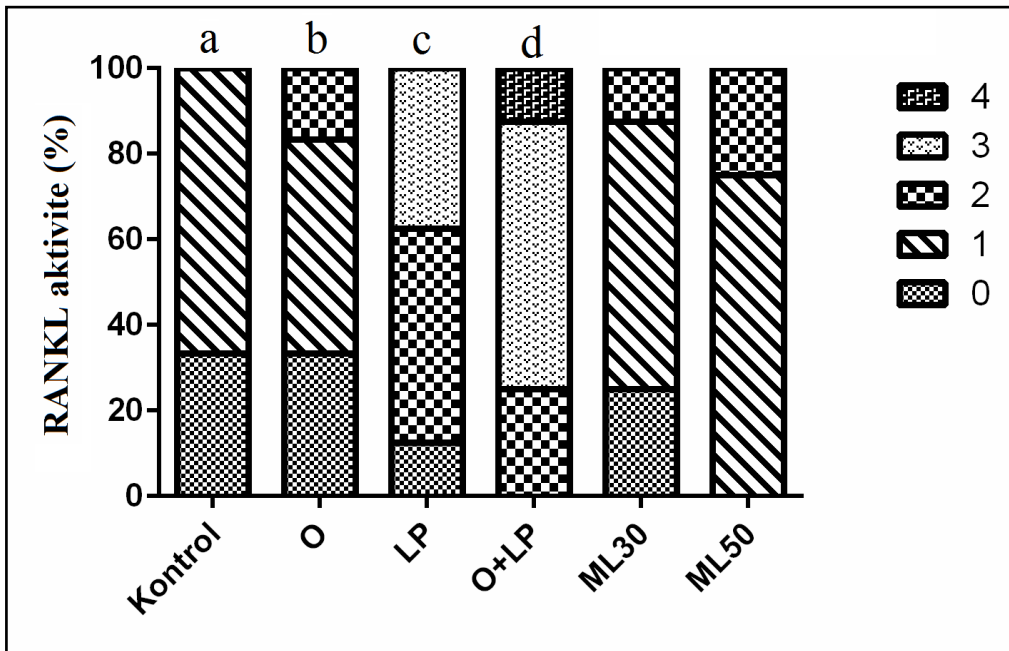
F: ML50 grubunda yoğun bir osteoblastik aktivite (beyaz ok) görülmektedir (200x).

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

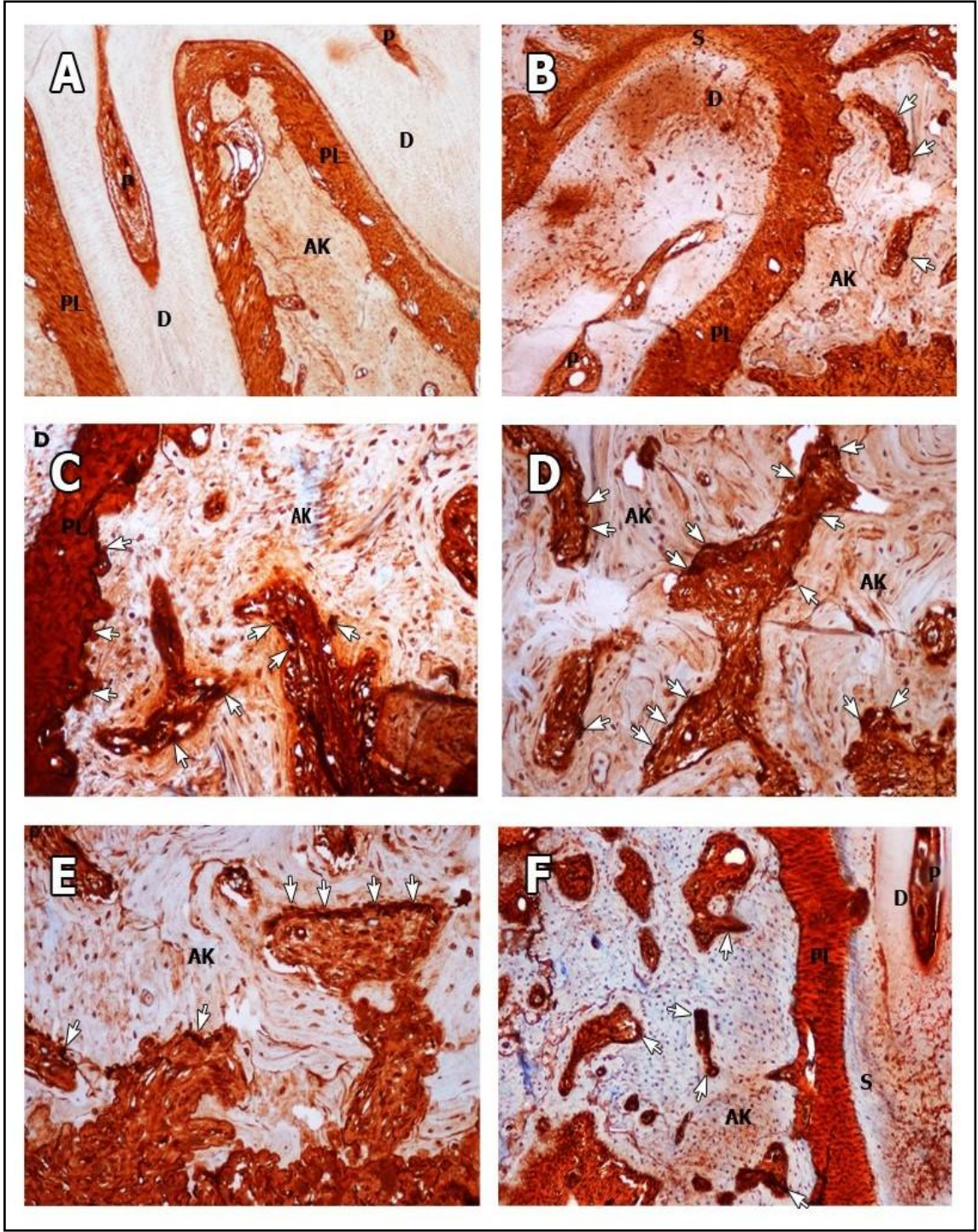
4.3.İmmünohistokimyasal Analizler

RANKL immünohistokimyasal değerlendirme

RANKL aktivitesine göre gruplar karşılaştırıldığında anlamlı farklılıklar bulundu ($p < 0.05$) (Şekil 4.7). Kontrol ve O grubundaki RANKL aktivitesi LP ve O+LP grubuna göre düşük bulundu ($p < 0.05$). LP grubundaki RANKL aktivitesi ML30 grubuna göre daha yüksek bulundu ($p < 0.05$). ML30 ve ML50 grupları arasında RANKL aktivitesi açısından anlamlı bir farklılık bulunmazken ($p > 0.05$), RANKL aktivitesi O+LP grubunda daha yüksek yoğunlukta idi (Şekil 4.8). RANKL aktivitesi O+LP grubunda daha yüksek olmasına rağmen, O+LP ile LP grubu arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık saptanmadı.



Şekil 4.7 Gruplara ait RANKL aktivitesi dağılımı ^a $p < 0.05$ LP ve O+LP gruplarından farklı; ^b $p < 0.05$ LP ve O+LP gruplarından farklı; ^c $p < 0.05$ ML30 grubundan farklı; ^d $p < 0.05$ ML30 ve ML50 gruplarından farklı



Şekil 4.8 Gruplara ait RANKL immünohistokimyasal boyama görüntüleri

A: K grubu (100x), B: O grubu (100x), C: LP grubu (200x), D: O+LP grubu (200x), E: ML30 grubu (200x), F: ML50 grubu (100x). Kontrol grubunda RANKL aktivitesi gözlenmezken, en yoğun RANKL aktivitesi (beyaz ok) LP ve O+LP gruplarında görülmektedir.

4.4 Biyokimyasal Analizler

IL-6 düzeyi

ELİZA analiz sonuçları değerlendirildiğinde LP ve O+LP grubunda IL-6 saptanma oranı diğer gruplara göre daha düşük olarak gözlemlendi (Çizelge 4.1). Gruplara ait ELİZA değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0.05$).

Çizelge 4.1 Gruplara ait serum IL-6 düzeyleri (pg/ml)

Gruplar	Saptanma Oranları (%)	Ort±SD	(Min-Maks) Ortanca
Kontrol	66,7	24,7±25,3	(0-68,9) 24,8
O	50	30±38,6	(0-84,7) 11,8
LP	37,5	13,8±21,2	(0-56,9) 0
O+LP	12,5	10,9±30,9	(0-87,4) 0
ML30	75	38,8±35,4	(0-107) 35,3
ML50	50	26,4±34	(0-86-7) 13,6

5. TARTIŞMA

Periodontal hastalık, yaygın görülen bir oral enflamasyon olup patogenizinde pek çok faktör etkilidir. Bu faktörlerden lokal olanları mikrobiyal dental plak ve dıştaşı olup bazı sistemik ve hormonal hastalıklar, ilaçların kullanımı, puberta gibi faktörler ise sistemiktir. Tüm bu faktörler arasında mikrobiyal dental plak primer etiyolojik faktördür [217]. Periodontitis, subgingival alandaki bakteri toplulukları tarafından başlatılır. Periodontal hastalık sürecinde hem bakterilerden (endotoksin, bakteriyal hyaluronidazlar) hem de konak hücresinden (kollajenazlar, proteazlar) salınan enzimler periodontal yıkımı meydana getirir [45]. Bakteri plağının antijenleri hücrel ve humoral immün cevabı doğururlar ve böylece uyarılmış immün sistem hücreleri doku yıkımı ile sonlanan olaylar zincirinin başlamasına neden olmaktadır[218].

Periodontal hastalık gibi lokal enfeksiyöz hastalıkların temelde iki mekanizma ile sistemik hastalıkların başlamasına neden olmasa da seyrini etkilediği düşünülmektedir. Bu mekanizmalardan ilki bakteriyemi yoluyla uzak bölgede enfeksiyona neden olunabilmesidir. Diğer ise periodontal hastalık etkeni olan bakterilerin konakta oluşturdukları immün yanıtta bazı pro-enflamatuvar sitokinlerin (IL-6, TNF- α) veya akut faz proteinlerinin (CRP, fibrinojen) uzak bölgede (karaciğer, pankreas, iskelet sistemi ve arterler) salınımını stimüle etmesi olabilir [219].

Osteoporoz, kemik kütesinin azalması ve kemik dokusunun dayanıklılığının azalması sonucu küçük travmalarla bile kırık oluşumunun kolaylaşması ile seyreden metabolik bir kemik hastalığıdır [220]. Osteoporoz, ekstrasellüler matriks organizasyonu ve enflamasyona karşı doku yanıtına etki ederek periodontal hastalıkların tedavisini olumsuz şekilde etkileyebilir. Periodontitis ve osteoporoz gibi kronik hastalıkların giderek yaygınlaştığı günümüzde terapötik yöntemlerin yanında önleyici yaklaşımların da gerekliliği bilinmektedir. Bu amaçla farklı materyaller, ürünler günümüze kadar çalışılmış ve alveoler kemik üzerine etkinlikleri gösterilmiştir[54, 60, 221].

Payne ve arkadaşları [222] periodontitisli, normal kemik yoğunluğuna sahip ve osteoporozlu/osteopenili postmenopozal kadınlarda alveoler kemik yüksekliği, yoğunluğu ve bel omurgasının kemik mineral yoğunluğunu karşılaştırmışlardır. Osteoporotik kadınlarda alveoler kemik yoğunluğu ve kemik kaybının normal kemik yoğunluğuna sahip postmenopozal kadınlara göre daha yüksek olduğunu saptamışlardır.

Östrojen eksikliğinin alveoler kemik yoğunluğunun kaybıyla ilişkili olduğunu, osteoporoz/osteopeni ve östrojen eksikliğinin postmenopozal kadınlarda alveoler kemik yoğunluğu için risk faktörü olduklarını bildirmişlerdir.

Bunun tersine, Weyant ve arkadaşları [223] yaptıkları çalışmada yaşlı kadınlarda sistemik kemik mineral yoğunluğu ile periodontal doku yıkımının klinik göstergeleri (klinik ataşman kaybı, cep derinliği, sondalamada kanama, plak ve diştaşı indeksi) arasındaki ilişkiyi değerlendirmiş, çalışmaya alınan kişilerin yaş, sigara içme durumu, ağızda kalan dişlerin sayısı kontrol edildikten sonra periodontal hastalık parametreleri ile sistemik kemik mineral yoğunluğu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.

Ratlarda deneysel periodontitis modeli için en çok tercih edilen molar dişlerin çevresine yerleştirilen ipek ligatür yöntemidir [67]. Ligatürle indüklenen periodontitis modelinin en önemli avantajı hastalığın öngörülebilir olaylar dizisi sonucuyla birkaç gün içerisinde alveoler kemik kaybıyla başlayacağıdır [224]. Bu modelde yerleştirilen ligatürler dentogingival bölgeye mekanik travma yapar. Doku bütünlüğünü azaltır, plak formasyonunu teşvik eder ve yoğun konak-plak etkileşimine izin verir. Böylece bu bölgede bakteri sayısında artış gözlenir ve bakteriler aracılığıyla periodontal hastalık başlar. Devamında bağ doku ve alveoler kemikte yıkım gözlenir [67]. Ligatür yerleştirilmesini takiben 3. günde yıkım şiddetlenir ve 7-11. günlerde yıkım en üst seviyeye ulaşır. 14. günden sonra kemik yıkımında azalma gözlenir [225]. Bu çalışmada da yerleştirilen ligatür alveoler kemik yıkımını arttırdı. Ancak bu modelin bazı limitasyonları vardır. Ligatür yerleştirilmesini takiben dokuda oluşan travma ve bakteri miktarındaki artışa bağlı olarak periodontal yıkımdaki pro-enflamatuvar, anti-enflamatuvar sitokin ve reaktif oksijen türleri, antioksidan aktiviteleri arasındaki denge kronik periodontitisin seyrinden farklı olarak akut bir enflamasyon gösterir [67]. Bir diğeri ise ratlarda dişlerin oklüzal, bukkal ve distal yöne doğru migrasyonu olup bu durum yerleştirilen ligatürün oluşturacağı yıkımın zamanla azalmasına neden olabilir. Bu yüzden ligatürle deneysel periodontitis oluşturmak için çalışma süresi ≤ 15 gün olmalıdır [226].

Oklüzal yüzeydeki atrizyona bağlı olarak ratların molar dişleri sürekli sürme durumundadır. Bu nedenle periodontal hastalığın görülmediği durumlarda bile mine-sement sınırı ile alveoler kret arasındaki mesafede artış gözlenebilir [227]. Bu durum

göz önüne alınarak bu çalışmada yaşa bağlı değişim olmaması için aynı doğum aralığına sahip ratlar kullanıldı.

Deneysel olarak oluşturulan periodontitis modelinde alveoler kemik kaybı mine- sement sınırı ile alveoler kret tepesi arasındaki mesafenin ölçümü veya kemik kaybı nedeniyle açığa çıkan kök yüzeylerinin alan ölçümü yapılarak hesaplanabilir [226]. Alan ölçümü kemik kaybını daha erken dönemde belirleyebilir ama ligatür yerleştirilmesinden 15 gün sonra her iki yöntemde kemik kaybı açısından doğru sonuçlar verir. Bunun yanında alan ölçümü 60. günde kemik kaybını belirlemede yetersiz kalırken mesafe ölçümünün daha güvenilir sonuçlar verdiği gösterilmiştir [226]. Bu nedenle mine- sement sınırı ile alveoler kret tepesi arasındaki mesafenin ölçümünün daha güvenilir bir yöntem olduğu söylenebilir. Bu çalışmada alveoler kemik kaybının hesaplanmasında stereomikroskop yardımıyla mine- sement sınırı ile alveoler kret tepesi arasındaki mesafenin ölçümü tercih edildi.

Deneysel osteoporozun oluşturulmasında düşük kalsiyum diyetinin alınması [148], retinoik asit kullanımı [155], bilateral overlerin alınması [143], immobilizasyon [156] gibi yöntemler vardır. Bu çalışmada deneysel osteoporozu oluşturmak için anestezi altında ratların overleri bilateral olarak alındı.

Melatonin hormonu başta pineal bez ve retina başta olmak üzere çeşitli periferik organ ve dokularda sentezlenir. Vücutta melatonin sekresyonu karanlık aydınlık siklusu ile sürdürülmektedir. Melatonin yapı olarak amfofilik ve küçük molekülü olması nedeniyle organizmada yaygın dağılım gösterir. Melatoninin, antioksidan, anti- enflamatuvar [191], immün düzenleyici [228], antikanseröz [229] ve kemik yapımı üzerine etkileri[187] yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bu çalışmada osteoporotik ratlarda oluşturulan deneysel periodontitis modelinde melatoninin alveoler kemik kaybı üzerine etkisi araştırıldı. Periodontal hastalık oluşumu ile eş zamanlı olarak intraperitonel melatonin uygulaması yapılarak melatoninin osteoporoz ve periodontal hastalık üzerindeki etkisi değerlendirildi.

Kara ve arkadaşları [25] deneysel periodontitis oluşturdukları ratlarda melatoninin immün düzenleyici ve antioksidan etkilerini araştırmışlardır. Toplamda 30 ratın alındığı çalışma kontrol, ligatürlü periodontitis ve ligatürlü periodontitis+melatonin grubu olmak üzere üç gruba ayrılmıştır. Deneysel periodontitisi oluşturmak için ligatür yerleştirimi sonrasında 4 hafta beklenmiştir. Melatonin uygulanması ise günlük 10 mg/kg olacak

şekilde intraperitonel olarak 15 gün süreyle verilmiştir. Histolojik değerlendirmeler sonucunda melatonin verilen grupta enflamatuvar sitokin (IL-1 β , TNF- α) seviyelerinin azaldığı, oksidatif parametrelerin (glutatyon, malonildialdehit) düzenlendiği ve periodontal yıkımın daha az olduğu gösterilmiştir. Bu bulguların sonucunda melatoninin, ratların periodontal dokularındaki oksidatif hasarı anti-enflamatuvar ve antioksidan özelliğiyle azalttığını vurgulamışlardır.

Periodontitiste plak birikimini takiben dentogingival epitelin altındaki bağlantı dokularında enflamatuvar hücre proliferasyonu görülür. Plak birikimi devam ettikçe artan kan akışına bağlı olarak bölgeye gelen enflamatuvar hücre infiltratı (nötrofil, makrofaj) artar. Polimorfonükleer lökositler patojen mikroorganizmaları elimine ederken oksidatif strese neden olarak gingival dokularda DNA hasarı oluşturur [230, 231]. Melatonin ise reseptörlerden bağımsız olarak toksik radikaller üzerine etki gösterir. Ayrıca genomdaki reseptörleri etkileyerek radikali detoksifiye eden enzimi ortaya çıkarır. Melatoninin oksidatif hasara karşı koruyucu olan başka bir mekanizması ise NOS'ın inhibisyonudur. NOS, nitrik asit üretir ve O₂⁻ varlığında yüksek toksik etkili OH⁻ radikale indirgenmektedir. Bu etkileriyle hücreyi oksidatif hasardan korur, enflamasyonu azaltır ve doku ödemi geriletir. [232].

Çalışmamızda deneysel periodontitis modeli oluşturulduktan sonra enflamatuvar hücre infiltratında anlamlı bir artış tespit edildi ve sistemik melatoninin uygulanması sonucunda ise özellikle ML30 grubunda enflamatuvar hücre infiltratında anlamlı bir azalma gözlemlendi.

Periodontal mikroçevrede artmış pro-enflamatuvar sitokinler osteoklast öncüllerini olgun osteoklastlara farklılaştırarak ve osteoklastların yaşam süresini uzatarak sayısını artırır [128]. Ayrıca, IL-6 kemik yıkımında rol alan matriks metalloproteinaz üretimini düzenler. IL-6 hem pro-enflamatuvar hem de anti-enflamatuvar özelliğe sahiptir. Östrojen ise periodontal ligamentte, kemik hücrelerinde ve kemik iliğinde pro-enflamatuvar sitokinlerin üretimini bloke ederek kemik kaybını durdurabilir.

Streckfus ve arkadaşlarının [233] yaptığı bir çalışmada östrojen tedavisi gören postmenopozal ve sağlıklı premenopozal kadınlarda alveoler kemik kaybı, alveoler kemik yoğunluğu, ikinci metakarpal kemik yoğunluğu, tükürük ve dişeti oluşu sıvısındaki IL-6 konsantrasyonları karşılaştırılmıştır. Postmenopozal kadınlarda

premenopozal kadınlara göre daha fazla alveoler kemik ve diş kaybı, azalmış alveoler ve ikinci metakarpal kemik yoğunluğu bulunmuştur. Buna ek olarak, östrojen tedavisi gören postmenopozal kadınların premenopozal kadınlara göre daha fazla tükürük IL-6 konsantrasyonuna sahip olduğu, ayrıca alveoler kemik ile ikinci metakarpal kemik yoğunluğu arasında güçlü bir ilişki bulunduğu saptanmıştır.

Bu çalışmada ligatürle oluşturulan deneysel periodontitis modelinde gelişen enflamasyon durumunun tespiti için ratlardan kardiyak ponksiyon ile alınan kan örneklerinden elde edilen serumda IL-6 seviyesi değerlendirildi. ELİZA sonuçlarına göre LP ve O+LP gruplarında IL-6 saptanma oranları düşük olmasına rağmen gruplar arasında IL-6 seviyeleri açısından anlamlı bir farklılık gözlenmedi.

Östrojen eksikliğine bağlı olarak sitokin artışı, stromal ve osteoblastik hücrelerin sitokinlere daha duyarlı hale gelmesine neden olmaktadır. Bu sitokinler ile stimüle edilen stromal hücreler ve preosteoblastlardan çok sayıda faktör salgılanmaktadır. Bunlar arasında IL-1, IL-6, makrofaj koloni stimüle edici faktör (M-CSF) ve RANKL bulunmaktadır. Bu faktörlerin tümü osteoklast prekürsörlerinin proliferasyonunu veya osteoklastogenezisi stimüle etmektedir [234].

RANK, RANKL ve OPG osteoklastogeneziste başlıca rol oynayan düzenleyici proteinlerdir [235]. RANKL'ın RANK ile bağlanması osteoklastların yaşam süresini, çoğalmasını, farklılaşmasını ve çok çekirdekli olmasını etkilediği gösterilmiştir. Kemik rezorpsiyonu üzerindeki bu stimülatör etki OPG ile engellenir [236]. RANKL ve OPG periodontal hastalık ve osteoporozdaki gibi kemik kaybının patolojik sürecinde ve fizyolojik kemiğin rekonstrüksiyonunda önemli rol oynar. Lipopolisakkaritlerin uyarısı sonucunda ya da enflamatuvar yanıt sırasında üretilen çeşitli sitokinler, kemokinler ve diğer mediyatörler periosteal osteoblastları uyararak osteoblast yüzeyindeki RANKL düzeyini arttırıp, osteoblastlardan OPG üretimini azaltarak osteoklastogenezisi uyarır [237]. Periodontal dokularda aktive olan T hücreleri RANKL açığa çıkararak doğrudan kemik rezorpsiyonuna neden olabilir. T hücrelerinin ürettiği TNF- α , IL-11 ve IL-17 gibi sitokinler osteoblastlar ve stromal hücrelerden RANKL salınımını arttırarak dolaylı yoldan da kemik rezorpsiyonuna neden olabilir [238].

Periodontitisli (agresif periodontitis, kronik periodontitis, immünosüpresif terapi gören kronik periodontitis), gingivitisli hastalar ve sağlıklı bireylerin dişeti oluşu sıvılarındaki RANKL, OPG düzeylerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada en düşük

RANKL düzeyi sağlıklı ve gingivitisli olan grupta bulunurken, sağlıklı gruptaki OPG seviyesi periodontitis ve gingivitis grubuna göre yüksek bulunmuştur. Periodontitisin her üç formunda da RANKL/OPG oranı anlamlı bir şekilde sağlıklı ve gingivitis grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. Bu nedenle RANKL/OPG oranına bakılarak periodontal hastalığın prognozunu tahmin edilebileceği bildirilmiştir [239].

2014 yılında yapılan bir çalışmada 30 periodontitisli diyabet hastasının alt ve üst çenesindeki yapışık dişetine %1'lik melatonin orabase krem topikal olarak uygulanmış, aynı şekilde sistemik olarak sağlıklı 30 bireye ise plasebo orabase krem 20 gün boyunca uygulanmıştır. Tedavi öncesi ve sonrası tükürükteki OPG, RANKL, melatonin değerlerine ve plazma melatonin seviyesine bakılmıştır. Periodontitisli diyabet hastalarının tükürük RANKL seviyesinde anlamlı bir yükseliş gözlenirken, tükürük OPG ve plazma melatonin değerlerinde anlamlı bir düşüş gözlenmiştir. Melatoninle tedavi sonrasında gingival indekste, cep derinliğinde ve tükürük RANKL düzeyinde anlamlı bir azalma, tükürük OPG değerlerinde anlamlı bir artış saptanmıştır. Bu bulgulara dayanarak melatoninin osteoklastogenezisin yavaşlatılmasında yeterli bir etkisi olduğu, alveoler kemiğin kalitesini arttırdığı ve periodontal hastalığın ilerlemesini önlediği gösterilmiştir [240].

Literatürde melatoninin klinik uygulanması ile ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada 20 yaş dışı çekim soketlerine 3 mg lokal melatonin veya plasebo uygulanmış ve melatoninin erken dönem anti-enflamatuvar, analjezik ve osteojenik etkisi değerlendirilmiştir. Operasyon öncesinde ve sonrasındaki 60. günde panoramik filmler alınarak, çekim bölgesinin kemik yoğunlukları karşılaştırılmıştır ve çekim bölgesine melatonin uygulaması kemik yoğunluğu açısından bir farklılığa neden olmamıştır. Ayrıca çekim sonrası soketten hemen alınan ve çekimden 60 dakika sonra alınan kanda ELİZA ile IL-6 ve nitrotirosin seviyelerine bakılmıştır. Melatonin uygulanan grupta IL-6 konsantrasyonu plasebo grubuna göre daha fazla bulunmuş ama anlamlı bir farklılık yaratmamıştır. Fakat, yapılan çalışmaları dikkate aldıklarında melatoninin anti-enflamatuvar ve analjezik etkisini gösterebilmek için daha yüksek dozlarda melatonin uygulanması gerektiğini vurgulamışlardır [241].

Luo ve arkadaşları deneysel periodontitis ve postmenopozal osteoporoz arasındaki ilişkiyi ratlara bilateral ovariektomi uygulayarak araştırmışlardır. Yapılan ovariektominin periodontal dokularda RANKL, IL-6, OPG salınımını arttırdığı tam

tersine IL-10 salınımını azattığı bulunmuş ve bu durum ilerleyen alveoler kemik kaybıyla sonuçlanmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda; ovariektomize ratların periodontal dokularının kemik yapım/yıkım belirteçlerinde ve sitokinlerinde meydana gelen değişikliklerin periodontal dokuların yıkımına katkıda bulunabileceği rapor edilmiştir[242].

Osteoporotik ratlarda gerçekleştirilen bir diğer çalışmada ligatürle oluşturulan deneysel periodontitiste osteoporozun osteoklast sayısı ve kemik RANKL miktarında artışla birlikte alveoler kemik kaybında artışa yol açtığı gösterilmiştir. Aynı zamanda RANKL ekspresyonunun hastalık ilerlemesiyle doğru orantılı olarak arttığı ve bu nedenle kemik hastalıklarında RANKL'ın teşhis belirteci olarak dikkate alınabileceği öne sürülmüştür [132]. Benzer olarak çalışmamızda da gruplar arasında RANKL aktivitesi açısından anlamlı farklılıklar bulundu. LP ve O+LP gruplarında RANKL aktivitesi yüksek iken, kontrol grubunda düşük düzeyde saptandı.

Amadei ve arkadaşları [243]ratlarda ligatürle indüklenmiş kemik kaybı ile farklı sürelerde ovariektomiyle indüklenen östrojen eksikliğinin alveoler kemik kaybı üzerine etkisini morfolometrik olarak değerlendirmişlerdir. Ligatür indüklemesi olan grupta daha fazla alveoler kemik kaybı bulunmuştur. Östrojen eksikliğinin plak akümülyasyonu göz ardı edildiğinde alveoler kemik miktarına etki etmediği fakat uzun dönemde ligatürle indüklenmiş alveoler kemik kaybını etkilediği gösterilmiştir. Ayrıca başka bir çalışmada deneysel periodontitis oluşturulan ratlarda östrojen eksikliğinin etkisi ve tedavisinde östrojen ile kalsitonin takviyesinin kemik kaybına etkisi araştırılmıştır. Ovariektomi sonrası oluşan östrojen eksikliğinin ligatürle indüklenen periodontitisle oluşan kemik kaybını anlamlı bir şekilde arttırdığı bulunmuştur. Takviye olarak alınan östrojenin alveoler kemik kaybını önlemede etkili olabileceği gösterilmiştir [244].

Zıt olarak, Anbinder ve arkadaşlarının [245]ratlarda yaptığı çalışmada ovariektomi sonrası meydana gelen östrojen eksikliğinin periodontal hastalık için bir risk faktörü olarak kabul edilemeyeceği bildirilmiştir. Çalışmalarında ovariektomi uygulanan grupta kontrol grubuna göre kilo alınımı gözlenmiştir. Periodontitis oluşturulan gruplarda daha fazla alveoler kemik kaybı ve furkasyon tutulumu gözlenmişken periodontitis oluşturulmayan test ve kontrol grubu arasında farklılık tespit edilmemiştir.

Koyama ve arkadaşları melatoninin kemik kütlesine etkisini 4 hafta boyunca her gün farelere sırasıyla 1, 5, 50 mg/kg melatonin enjeksiyonu uygulayarak araştırmış ve günlük 5 ve 50 mg/kg verilen melatoninin kemik mineral yoğunluğunu, kemik kütlesini ve trabeküler kalınlığı anlamlı bir şekilde arttırdığı saptanmıştır. Uygulanan bu tedavinin kemik rezorpsiyon parametrelerini ve osteoklast sayısını anlamlı şekilde azalttığı fakat histomorfometrik kemik formasyon parametrelerini (kemik formasyon oranı, mineral apozisyon oranı, kemik hacmi) arttırmadığı bulunmuştur. Bu iskeletsel etkinin RANKL ile ilişkili osteoklast formasyonu ve aktivitesinin melatonin aracılığıyla azaltılması şeklinde gerçekleştirilebileceği bildirilmiştir[33]. Çalışmamızda O+LP grubunda osteoklast sayısı fazla olup melatonin uygulanmasıyla osteoklast sayısı azalmıştır. Osteoklast sayısındaki azalma kontrol seviyesinde olmasa da periodontitis seviyesindedir.

Uslu ve arkadaşları ratlarda ovariektomi sonrası 4 hafta boyunca günlük 10 veya 30 mg/kg verilen melatoninin kemiğin trabeküler kalınlığını, femur ve vertebranın trabeküler alanını ve femurun kortikal kalınlığını arttırdığını göstermiştir. Ancak melatonin ovariektomi sonrası kemikte oluşan etkileri tam olarak tersine çevirememiştir ve hidroksiprolin seviyesi, trabeküler sayısı, osteoklast ve osteoblast sayısında değişiklik olmamıştır[246].

Satomura ve arkadaşları [247] melatoninin in vitro olarak insan osteoblastlarının farklılaşması ve çoğalmasına nasıl bir etki gösterdiğini belirlemek ve kemik kırıklarında, çeşitli osteotomilerde, kemik distraksiyonunda tedavi süreçlerini kısaltmak için farmakolojik ajan olarak uygulanabilirliğini göstermek amacıyla yaptıkları çalışmalarında 30 hastanın mandibuler veya iliak kemiğinden osteoblastik hücreler izole edilmiştir. Bu hücrelerin kültürlerini elde etmek için 14-28 gün muhafaza edilmiştir. Ters transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu ve Western-blot analiziyle insan osteoblastlarının melatonin 1a reseptörünü salgıladığı ve doza bağımlı olarak melatoninin farmakolojik konsantrasyonlarda insan osteoblastlarının çoğalmasını ve alkalen fosfataz aktivitesini stimüle ettiği gösterilmiştir. Ayrıca melatonin in vitro olarak tip 1 kollajen, osteopontin, kemik sialoprotein ve osteokalsinin gen ekspresyonlarını doza bağlı bir şekilde tetiklediği ve mineralize matriks oluşumunu uyardığı tespit edilmiştir. Ek olarak bu çalışmada in vivo olarak farelere 21 gün boyunca intraperitoneal olarak melatonin (100 mg/kg) uygulanmıştır ve melatoninin rat femurlarında yeni oluşan kortikal kemik hacmini arttırdığı gösterilmiştir. Çalışmadan

elde edilen sonuçlar melatoninin insan osteoblastlarının farklılaşmasını direk olarak hızlandırdığı ve melatoninin farmakolojik dozlarda kemik rejenerasyonunu tetiklemek için uygulanabileceği önerilmiştir. Benzer olarak, çalışmamızda da melatonin uygulanan gruplardaki osteoblast sayısı diğer gruplara göre daha fazla bulundu fakat istatistiksel açıdan anlamlı değildi. Bu bulgulara dayanarak 30 mg/kg veya 50 mg/kg melatonin uygulamasının osteoporoz ve periodontitisin neden olduğu osteoblastik aktivitedeki azalmayı önleyerek ve kemik yapımını indüklediği söylenebilir.

Yapılan bu çalışmaların aksine, Ladizesky ve arkadaşları ovariektomize ratlarda melatoninin kemik metabolizması üzerine etkisini incelemek için bir çalışma yapmışlardır. Ratlara melatonin günlük 500µg/gün olacak şekilde içme suyuyla verilmiştir. Ratlar kontrol ve ovariektomi uygulanan grup olarak ayrıldıktan sonra kendi içlerinde sadece su veya melatonin verilmesine göre toplamda 4 gruba ayrılmıştır. 15, 30, 45 ve 60. günde kan örnekleri alınmıştır. Ovariektomi sonrası 30. ve 60. günde ratların idrarında deoksipiridinolin anlamlı bir şekilde yüksek bulunurken melatonin verilen grupta 30. günde artış görülmemiştir. Melatonin verilen ovariektomi grubunda 15. günde serum fosfor ve kemik alkalın fosfataz seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı bir yükseliş göstermiştir, fakat cerrahi sonrası 60. günde kemik mineral yoğunluğunda, mineral bileşenlerinde ve kemik alanında anlamlı bir düşüş gözlenmiş olup bu durum melatonin ile düzeltilememiştir. Ovariektomi sonrası kemik remodelasyonu için farmakolojik dozda verilen melatonin yanında yeterli östrojen konsantrasyonunun da gerekebileceği vurgulanmıştır [248].

Histing ve arkadaşları [249] farelerde femur kırık modelinde melatoninin kallus formasyonuna, erken ve geç dönem kırık iyileşmesinin biyomekaniği üzerine etkisini araştırmışlardır. Test grubuna günde 50 mg/kg melatonin verilmiştir ve 2 hafta sonunda 10 rat radyolojik, biyomekanik ve histomorfometrik analizler için, 5 tanesi ise protein biyokimyasal analiz için sakrifiye edilmiştir. Geriye kalan 15 rata günlük melatonin 5 hafta boyunca verilmiştir. 2. hafta sonundaki biyomekanik analizlerde test grubundaki örneklerde bükülme sertliği kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuşken 5. hafta sonunda ise iki grup arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Test grubunda 2. haftada kırık dokusunun miktarı kontrol grubuna göre biraz daha yüksek miktardayken, 5. haftada karşılaştırılabilir bir farklılık kalmamıştır. 2. haftada test ve kontrol grubu arasında toplam kallus miktarı neredeyse aynı iken 5. haftada test grubundaki kallus boyutu kontrol grubuna göre anlamlı derecede büyük olup bu durum melatonin tedavisi sonrası gecikmiş remodelasyon sürecini belirtmiştir. Western-blot

analizleri melatonin tedavisi sonrası RANKL ve Tip 1 kollajenin salınımını anlamlı derecede azalttığını göstermiştir. RANKL salınımının azalmasıyla yeni oluşan kemiğin kallusu içinde TRAP pozitif osteoklastların sayısının azaldığı gösterilmiştir. Kırık iyileşmesi sırasında yeterli remodelasyon için kemik rezorpsiyonu gereklidir. Melatoninin RANKL ile ilişkili osteoklastların aktivasyonunu azaltarak kemik rezorpsiyonunun baskılanmasıyla kırık iyileşmesini bozduğu sonucuna varılmıştır.

Bunun yanı sıra melatonin kemik rezorpsiyonunun önlenmesine indirekt olarak da etki eder. Kalsiyum ve fosfat metabolizmasının düzenlenmesinde melatoninin etkisinin olabileceği gösterilmiştir. Melatoninin yaşlanma ve menopozla ilişkili olarak azalması başlangıçta plazma kalsiyum seviyelerinin azalmasıyla sonuçlandığı sonrasında PTH'nin salınımının artmasına ve kalsitonin salınımının baskılanmasına yol açtığı bildirilmiştir. Dolaşımda PTH'nin artması ve serum kalsitonin seviyesinin azalması kemik rezorpsiyonunun artmasına neden olur [250]. Yetişkin kadınlarda yapılan 3 yıl takipli bir çalışmada günlük eser miktarda östrojen ile 75 mg melatonin alınmıştır. Bu uygulama kadınlarda kemik mineral yoğunluğunda anlamlı bir yükselişe neden olmuştur[251].

6. SONUÇLAR

Çalışmamızın sınırları dahilinde;

- Ligatür uygulaması ratlarda alveoler kemik kaybını arttırdı.

- Morfometrik ölçüm sonuçlarına göre; deneysel osteoporoz ve periodontitis modeli oluşturulduktan sonra 30 ve 50 mg/kg melatonin uygulanması periodontal yıkımı azalttı. (Sistemik olarak verilen 30 mg/kg melatonin grubunda alveoler kemik yıkım miktarı Kontrol grubu ile benzer bulundu.)

-Histopatolojik sonuçlara göre 30 ve 50 mg/kgmelatoninuygulaması osteoporotik periodontitisli ratlarda enflamatuvar hücre infiltrat oranını, RANKL aktivitesi ve osteoklastik aktiviteyi azaltarak periodontal yıkımı engellerken, osteoblastik aktiviteyi arttırdığı saptanmıştır.

- ELİZA sonuçlarında IL-6'nın saptanma oranı özellikle periodontitis gruplarında düşük olup gruplar arasında anlamlı farklılık gözlenmedi.

- Melatoninin immünohistokimyasal ve morfometrik olarak doku yıkımını önlemedeki etkisi gösterilmesine rağmen melatoninin, periodontitis ve osteoporoz üzerindeki etki mekanizmalarını açığa çıkartmak amacıyla ileri dönem çalışmalara gereksinim vardır.

7. KAYNAKLAR

- [1] Kinane D F and Lappin D F (2001). Clinical, pathological and immunological aspects of periodontal disease. *Acta Odontol Scand*, 59(3): 154-60.
- [2] Greenstein G and Caton J (1990). Periodontal disease activity: a critical assessment. *J Periodontol*, 61(9): 543-52.
- [3] Goodson J M (1992). Diagnosis of periodontitis by physical measurement: interpretation from episodic disease hypothesis. *J Periodontol*, 63(4 Suppl): 373-82.
- [4] Carranza F, Newman M, Takei H, Klokkevold P (2014). Carranza's Clinical Periodontology. 12th edition, Elsevier Saunders Co, St Louis: 371.
- [5] Sahingur S E and Cohen R E (2004). Analysis of host responses and risk for disease progression. *Periodontology 2000*, 34: 57-83.
- [6] Listgarten M A (1987). Nature of periodontal diseases: pathogenic mechanisms. *J Periodontal Res*, 22(3): 172-8.
- [7] Graves D T and Cochran D (2003). The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol*, 74(3): 391-401.
- [8] Kanis J A, Melton L J 3rd, Christiansen C, Johnston C C, Khaltsev N (1994). The diagnosis of osteoporosis. *J Bone Miner Res*, 9(8): 1137-41.
- [9] Delmas P D, Chapurlat R D (2006). Osteoporosis. In: DeGroot L J, Jameson J L, ed. *Endocrinology. 5th edition, Elsevier, Philadelphia*: 1751-53.
- [10] Melton L J, 3rd (1995). How many women have osteoporosis now? *J Bone Miner Res*, 10(2): 175-7.
- [11] Groen J J, Duyvensz F, and Halsted J A (1960). Diffuse alveolar atrophy of the jaw (non-inflammatory form of paradental disease) and pre-senile osteoporosis. *Gerontol Clin (Basel)*, 2: 68-86.
- [12] Christiansen C (1993). Skeletal osteoporosis. *J Bone Miner Res*, 8(2): S475-80.
- [13] Famili P, Cauley J, Suzuki J B, and Weyant R (2005). Longitudinal study of periodontal disease and edentulism with rates of bone loss in older women. *J Periodontol*, 76(1): 11-5.
- [14] Friedlander A H (2002). The physiology, medical management and oral implications of menopause. *J Am Dent Assoc*, 133(1): 73-81.
- [15] Tezal M, Wactawski-Wende J, Grossi S G, Ho A W, Dunford R, and Genco R J (2000). The relationship between bone mineral density and periodontitis in postmenopausal women. *J Periodontol*, 71(9): 1492-8.
- [16] Moeintaghavi A, Pourjavad M, Dadgar S, and Tabbakh N S (2013). Evaluation of the association between periodontal parameters, osteoporosis and osteopenia in post menopausal women. *J Dent (Tehran)*, 10(5): 443-8.
- [17] Hildebolt C F, Pilgram T K, Dotson M, Yokoyama-Crothers N, Muckerman J, Hauser J, Cohen S, Kardaris E, Vannier M W, Hanes P, Shrout M K, and Civitelli R (1997). Attachment loss with postmenopausal age and smoking. *J Periodontal Res*, 32(7): 619-25.
- [18] Lundstrom A, Jendle J, Stenstrom B, Toss G, and Ravald N (2001). Periodontal conditions in 70-year-old women with osteoporosis. *Swed Dent J*, 25(3): 89-96.
- [19] Rifkin B R, Vernillo A T, and Golub L M (1993). Blocking periodontal disease progression by inhibiting tissue-destructive enzymes: a potential therapeutic role for tetracyclines and their chemically-modified analogs. *J Periodontol*, 64(8 Suppl): 819-27.
- [20] Howell T H, Jeffcoat M K, Goldhaber P, Reddy M S, Kaplan M L, Johnson H G, Hall C M, and Williams R C (1991). Inhibition of alveolar bone loss in beagles with the NSAID naproxen. *J Periodontal Res*, 26(6): 498-501.

- [21] Delima A J, Oates T, Assuma R, Schwartz Z, Cochran D, Amar S, and Graves D T (2001). Soluble antagonists to interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF) inhibits loss of tissue attachment in experimental periodontitis. *J Clin Periodontol*, 28(3): 233-40.
- [22] Lane N, Armitage G C, Loomer P, Hsieh S, Majumdar S, Wang H Y, Jeffcoat M, and Munoz T (2005). Bisphosphonate therapy improves the outcome of conventional periodontal treatment: results of a 12-month, randomized, placebo-controlled study. *J Periodontol*, 76(7): 1113-22.
- [23] 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): 1089-94.
- [24] Elburki M S, Rossa C, Guimaraes M R, Goodenough M, Lee H M, Curylofo F A, Zhang Y, Johnson F, and Golub L M (2014). A novel chemically modified curcumin reduces severity of experimental periodontal disease in rats: initial observations. *Mediators Inflamm*, 2014: 959471.
- [25] Kara A, Akman S, Ozkanlar S, Tozoglu U, Kalkan Y, Canakci C F, and Tozoglu S (2013). Immune modulatory and antioxidant effects of melatonin in experimental periodontitis in rats. *Free Radic Biol Med*, 55: 21-6.
- [26] 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 Periodontol Res*, 49(1): 45-54.
- [27] Chava V K, Sirisha K (2012). Melatonin: A Novel Indolamine in Oral Health and Disease. *Int J Dent*: 9 pages.
- [28] Arendt J (2000). Melatonin, circadian rhythms, and sleep. *N Engl J Med*, 343(15): 1114-6.
- [29] Thomas-Zapico C, Coto-Montes A (2007). Melatonin as antioxidant under pathological processes. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov*, 1(1): 63-82.
- [30] Gomez-Florit M, Ramis J M, and Monjo M (2013). Anti-fibrotic and anti-inflammatory properties of melatonin on human gingival fibroblasts in vitro. *Biochemical Pharmacology*, 86(12): 1784-1790.
- [31] Nunes Oda S and Pereira Rde S (2008). Regression of herpes viral infection symptoms using melatonin and SB-73: comparison with Acyclovir. *J Pineal Res*, 44(4): 373-8.
- [32] Toubi E and Shoenfeld Y (2007). Protective autoimmunity in cancer (review). *Oncol Rep*, 17(1): 245-51.
- [33] Koyama H, Nakade O, Takada Y, Kaku T, and Lau K H (2002). Melatonin at pharmacologic doses increases bone mass by suppressing resorption through down-regulation of the RANKL-mediated osteoclast formation and activation. *J Bone Miner Res*, 17(7): 1219-29.
- [34] Almughrabi O M, Marzouk K M, Hasanato R M, and Shafik S S (2013). Melatonin levels in periodontal health and disease. *J Periodontol Res*, 48(3): 315-21.
- [35] Cardinali D P, Ladizesky M G, Boggio V, Cutrera R A, and Mautalen C (2003). Melatonin effects on bone: experimental facts and clinical perspectives. *J Pineal Res*, 34(2): 81-7.
- [36] Witt-Enderby P A, Radio N M, Doctor J S, and Davis V L (2006). Therapeutic treatments potentially mediated by melatonin receptors: potential clinical uses in

- the prevention of osteoporosis, cancer and as an adjuvant therapy.*J Pineal Res*, 41(4): 297-305.
- [37] Nakade O, Koyama H, Ariji H, Yajima A, and Kaku T (1999). Melatonin stimulates proliferation and type I collagen synthesis in human bone cells in vitro.*J Pineal Res*, 27(2): 106-10.
- [38] Cardinali D P, Ladizesky M G, Boggio V, Cutrera R A, Mautalen C (2003). Melatonin effects on bone: experimental facts and clinical perspectives.*J Pineal Res*, 34(2): 81-7.
- [39] Brown L J and Loe H (1993). Prevalence, extent, severity and progression of periodontal disease.*Periodontol 2000*, 2: 57-71.
- [40] Flemmig T F (1999). Periodontitis.*Ann Periodontol*, 4(1): 32-8.
- [41] Genco R J (1996). Current view of risk factors for periodontal diseases.*J Periodontol*, 67(10 Suppl): 1041-9.
- [42] Page R C and Beck J D (1997). Risk assessment for periodontal diseases.*Int Dent J*, 47(2): 61-87.
- [43] Page R C (1998). The pathobiology of periodontal disease may affect systemic diseases.*Ann Periodontol*, 3(1): 108-120.
- [44] Elter J R, Beck J D, Slade G D, and Offenbacher S (1999). Etiologic models for incident periodontal attachment loss in older adults.*J Clin Periodontol*, 26(2): 113-23.
- [45] Kinane D F (2001). Causation and pathogenesis of periodontal disease.*Periodontol 2000*, 25: 8-20.
- [46] Susa S, Shilby O, Zambon JJ (1995). Periodontal disorders effecting periodontium.*Periodontology 2000*: 42-59.
- [47] Aas J A, Paster B J, Stokes L N, Olsen I, and Dewhirst F E (2005). Defining the normal bacterial flora of the oral cavity.*J Clin Microbiol*, 43(11): 5721-32.
- [48] Ximenez-Fyvie L A, Haffajee A D, and Socransky S S (2000). Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis.*J Clin Periodontol*, 27(9): 648-57.
- [49] Lindhe J (2008). Clinical periodontology and implant dentistry.*5th editon, Blackwell Munksgaard, Oxford*: 285-99.
- [50] Cochran D L (2008). Inflammation and bone loss in periodontal disease.*J Periodontol*, 79(8 Suppl): 1569-76.
- [51] Tonetti M S, Chapple IL; Working Group 3 of 7th European Workshop on Periodontology (2011). Biological approaches to the development of novel periodontal therapies - Consensus of the 7th European Workshop on Periodontology.*J Clin Periodontol*, 38(11 suppl): 114-8.
- [52] Kantarci A, Hasturk H, and Van Dyke T E (2006). Host-mediated resolution of inflammation in periodontal diseases.*Periodontol 2000*, 40: 144-63.
- [53] Fleisch H A (1997). Bisphosphonates: preclinical aspects and use in osteoporosis.*Ann Med*, 29(1): 55-62.
- [54] Mitsuta T, Horiuchi H, and Shinoda H (2002). Effects of topical administration of clodronate on alveolar bone resorption in rats with experimental periodontitis.*J Periodontol*, 73(5): 479-86.
- [55] Nevins M, Giannobile W V, McGuire M K, Kao R T, Mellonig J T, Hinrichs J E, McAllister B S, Murphy K S, McClain P K, Nevins M L, Paquette D W, Han T J, Reddy M S, Lavin P T, Genco R J, and Lynch S E (2005). Platelet-derived growth factor stimulates bone fill and rate of attachment level gain: results of a large multicenter randomized controlled trial.*J Periodontol*, 76(12): 2205-15.

- [56] Preshaw P M (2008). Host response modulation in periodontics. *Periodontol* 2000, 48: 92-110.
- [57] Heasman P A, Offenbacher S, Collins J G, Edwards G, and Seymour R A (1993). Flurbiprofen in the prevention and treatment of experimental gingivitis. *J Clin Periodontol*, 20(10): 732-8.
- [58] Krotz F, Schiele T M, Klauss V, and Sohn H Y (2005). Selective COX-2 inhibitors and risk of myocardial infarction. *J Vasc Res*, 42(4): 312-24.
- [59] Graves D T, Delima A J, Assuma R, Amar S, Oates T, and Cochran D (1998). Interleukin-1 and tumor necrosis factor antagonists inhibit the progression of inflammatory cell infiltration toward alveolar bone in experimental periodontitis. *J Periodontol*, 69(12): 1419-25.
- [60] Oates T W, Graves D T, and Cochran D L (2002). Clinical, radiographic and biochemical assessment of IL-1/TNF-alpha antagonist inhibition of bone loss in experimental periodontitis. *J Clin Periodontol*, 29(2): 137-43.
- [61] Martuscelli G, Fiorellini J P, Crohin C C, and Howell T H (2000). The effect of interleukin-11 on the progression of ligature-induced periodontal disease in the beagle dog. *J Periodontol*, 71(4): 573-8.
- [62] Madden T E and Caton J G (1994). Animal models for periodontal disease. *Methods Enzymol*, 235: 106-19.
- [63] Selvig K A (1994). Discussion: animal models in reconstructive therapy. *J Periodontol* 65(12): 1169-72.
- [64] Garant P R and Cho M I (1979). Histopathogenesis of Spontaneous Periodontal-Disease in Conventional Rats .1. Histometric and Histologic-Study. *Journal of Periodontal Research*, 14(4): 297-309.
- [65] Klausen B (1991). Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. *J Periodontol*, 62(1): 59-73.
- [66] Xavier S, Hervé B, Assem S, Pierre L (2010). Experimental animal models in periodontology: a review. *Open Dent J*: 37-47.
- [67] 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): 1062-8.
- [68] Yamasaki A, Nikai H, Niitani K, and Ijuhin N (1979). Ultrastructure of the junctional epithelium of germfree rat gingiva. *J Periodontol*, 50(12): 641-8.
- [69] Listgarten M A (1975). Similarity of epithelial relationships in the gingiva of rat and man. *J Periodontol*, 46(11): 677-80.
- [70] Heijl L, Wennstrom J, Lindhe J, and Socransky S S (1980). Periodontal disease in gnotobiotic rats. *J Periodontal Res*, 15(4): 405-19.
- [71] Noronha I L, Niemi Z, Stein H, and Waldherr R (1995). Cytokines and growth factors in renal disease. *Nephrol Dial Transplant*, 10(6): 775-86.
- [72] Balkwill F R and Burke F (1989). The cytokine network. *Immunol Today*, 10(9): 299-304.
- [73] Akyol G, Şengil A Z, Baysal B (1994). İnterlökinler. *SÜ Tıp Fak Derg* 10(1): 117-23.
- [74] Guner I, Ozmen D, Bayındır D (1997). Cytokines. *Turkiye Klinikleri J Med Sci*, 17: 65-74.
- [75] 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): 817-28.
- [76] Moreira P R, Lima P M, Sathler K O, Imanishi S A, Costa J E, Gomes R S, Gollob K J, and Dutra W O (2007). Interleukin-6 expression and gene

- polymorphism are associated with severity of periodontal disease in a sample of Brazilian individuals. *Clin Exp Immunol*, 148(1): 119-26.
- [77] Matsuki Y, Yamamoto T, and Hara K (1992). Detection of inflammatory cytokine messenger RNA (mRNA)-expressing cells in human inflamed gingiva by combined in situ hybridization and immunohistochemistry. *Immunology*, 76(1): 42-7.
- [78] Trotta P P (1991). Cytokines: an overview. *Am J Reprod Immunol*, 25(3): 137-41.
- [79] Shao M Y, Huang P, Cheng R, and Hu T (2009). Interleukin-6 polymorphisms modify the risk of periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Zhejiang Univ Sci B*, 10(12): 920-7.
- [80] Kishimoto T (1992). Interleukin-6 and its receptor in autoimmunity. *J Autoimmun*, 5(A suppl): 123-32.
- [81] Barkhudaryan N and Dunn A J (1999). Molecular mechanisms of actions of interleukin-6 on the brain, with special reference to serotonin and the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Neurochem Res*, 24(9): 1169-80.
- [82] Barton B E (1996). The biological effects of interleukin 6. *Med Res Rev*, 16(1): 87-109.
- [83] Frei K, Malipiero U V, Leist T P, Zinkernagel R M, Schwab M E, and Fontana A (1989). On the cellular source and function of interleukin 6 produced in the central nervous system in viral diseases. *Eur J Immunol*, 19(4): 689-94.
- [84] Geivelis M, Turner D W, Pederson E D, and Lamberts B L (1993). Measurements of interleukin-6 in gingival crevicular fluid from adults with destructive periodontal disease. *J Periodontol*, 64(10): 980-3.
- [85] Costa P P, Trevisan G L, Macedo G O, Palioto D B, Souza S L, Grisi M F, Novaes A B, Jr., and Taba M, Jr. (2010). Salivary interleukin-6, matrix metalloproteinase-8, and osteoprotegerin in patients with periodontitis and diabetes. *J Periodontol*, 81(3): 384-91.
- [86] Shimada Y, Komatsu Y, Ikezawa-Suzuki I, Tai H, Sugita N, and Yoshie H (2010). The effect of periodontal treatment on serum leptin, interleukin-6, and C-reactive protein. *J Periodontol*, 81(8): 1118-23.
- [87] D'Aiuto F, Nibali L, Parkar M, Suvan J, and Tonetti M S (2005). Short-term effects of intensive periodontal therapy on serum inflammatory markers and cholesterol. *J Dent Res*, 84(3): 269-73.
- [88] Tonetti M S, D'Aiuto F, Nibali L, Donald A, Storry C, Parkar M, Suvan J, Hingorani A D, Vallance P, and Deanfield J (2007). Treatment of periodontitis and endothelial function. *N Engl J Med*, 356(9): 911-20.
- [89] Kono Y, Beagley K W, Fujihashi K, McGhee J R, Taga T, Hirano T, Kishimoto T, and Kiyono H (1991). Cytokine regulation of localized inflammation. Induction of activated B cells and IL-6-mediated polyclonal IgG and IgA synthesis in inflamed human gingiva. *J Immunol*, 146(6): 1812-21.
- [90] Yamazaki K, Nakajima T, Gemmell E, Polak B, Seymour G J, and Hara K (1994). IL-4- and IL-6-producing cells in human periodontal disease tissue. *J Oral Pathol Med*, 23(8): 347-53.
- [91] Bartold P M and Haynes D R (1991). Interleukin-6 production by human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res*, 26(4): 339-45.
- [92] Horowitz M C (1993). Cytokines and estrogen in bone: anti-osteoporotic effects. *Science*, 260(5108): 626-7.
- [93] Tamura T, Udagawa N, Takahashi N, Miyaura C, Tanaka S, Yamada Y, Koishihara Y, Ohsugi Y, Kumaki K, Taga T, and et al. (1993). Soluble

- interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(24): 11924-8.
- [94] Ohsaki Y, Takahashi S, Scarcez T, Demulder A, Nishihara T, Williams R, Roodman G D (1992). Evidence of an autocrine/paracrine role for interleukin-6 in bone resorption by giant cells from giant cell tumors of bone. *Endocrinology* 131(5): 2229-34.
- [95] Blair J M, Zheng Y, and Dunstan C R (2007). RANK ligand. *Int J Biochem Cell Biol*, 39(6): 1077-81.
- [96] Boyce B F, Xing L (2007). Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther*, 9(1): 1-20.
- [97] Iwamoto K, Miyamoto T, Sawatani Y, Hosogane N, Hamaguchi I, Takami M, Nomiyama K, Takagi K, and Suda T (2004). Dimer formation of receptor activator of nuclear factor kappaB induces incomplete osteoclast formation. *Biochem Biophys Res Commun*, 325(1): 229-34.
- [98] Boyle W J, Simonet W S, and Lacey D L (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 423(6937): 337-42.
- [99] 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): 460-70.
- [100] Hofbauer L C (1999). Osteoprotegerin ligand and osteoprotegerin: novel implications for osteoclast biology and bone metabolism. *Eur J Endocrinol*, 141(3): 195-210.
- [101] Wittrant Y, Theoleyre S, Couillaud S, Dunstan C, Heymann D, Redini F (2004). Relevance of an in vitro osteoclastogenesis system to study receptor activator of NF-kB ligand and osteoprotegerin biological activities *Exp Cell Res*, 293(2): 292-301.
- [102] 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): 165-76.
- [103] McCauley L K and Nohutcu R M (2002). Mediators of periodontal osseous destruction and remodeling: principles and implications for diagnosis and therapy. *J Periodontol*, 73(11): 1377-91.
- [104] Boyce B F, Xing L, and Chen D (2005). Osteoprotegerin, the bone protector, is a surprising target for beta-catenin signaling. *Cell Metab*, 2(6): 344-5.
- [105] Kong Y Y, Feige U, Sarosi I, Bolon B, Tafuri A, Morony S, Capparelli C, Li J, Elliott R, McCabe S, Wong T, Campagnuolo G, Moran E, Bogoch E R, Van G, Nguyen L T, Ohashi P S, Lacey D L, Fish E, Boyle W J, and Penninger J M (1999). Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature*, 402(6759): 304-9.
- [106] Vernal R, Dutzan N, Hernandez M, Chandia S, Puente J, Leon R, Garcia L, Del Valle I, Silva A, and Gamonal J (2006). High expression levels of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand associated with human chronic periodontitis are mainly secreted by CD4+ T lymphocytes. *J Periodontol*, 77(10): 1772-80.
- [107] 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): 987-98.
- [108] Lenchik L and Sartoris D J (1998). Orthopedic aspects of metabolic bone disease.*Orthop Clin North Am*, 29(1): 103-34.
- [109] Meray J, Peker Ö (2012). Osteoporozda tanı ve tedavi *Gelanos Yayınevi, İstanbul* 7-147.
- [110] National Osteoporosis Foundation America's bone health: the state of osteoporosis and low bone mass in our nation (2009) (<http://www.nof.org/osteoporosis/diseasefacts.htm>).
- [111] WHO (1994). Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. *World Health Organ Tech Rep Ser*, 843: 1-129.
- [112] Blake G M and Fogelman I (1997). Technical principles of dual energy x-ray absorptiometry.*Semin Nucl Med*, 27(3): 210-28.
- [113] Ser. W H O T R (1994). Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis.*Report of a WHO Study Group.*: 1-129.
- [114] Dinçer G, Yüksel E K (2008). Osteoporozun kliniği ve risk faktörleri.*Türkiye Klinikleri J Orthop & Traumatol-Special Topics*, 1(3): 27-31.
- [115] Riggs B L, Khosla S, Melton III LJ (2001). Type 1/Type 2 Model for involutional osteoporosis.*In: Marcus R, Feldman DD, Kelsey J, ed. Osteoporosis. San Diego: Academic Press: 49-58.*
- [116] Lappe J M (1994). Bone fragility: assessment of risk and strategies for prevention.*J Obstet Gynecol Neonatal Nurs*, 23(3): 260-8.
- [117] Borer K T (2005). Physical activity in the prevention and amelioration of osteoporosis in women : interaction of mechanical, hormonal and dietary factors.*Sports Med*, 35(9): 779-830.
- [118] Canalish E, Giustina A (2001). Glucocorticoid induced osteoporosis: summary of workshop.*J Clin Endocrinol Metab*, 86(12): 5681-85.
- [119] Wasaha S and Angelopoulos F M (1996). What every woman should know about menopause.*Am J Nurs*, 96(1): 24-32; quiz 33.
- [120] Kanis J A, Stevenson M, McCloskey E V, Davis S, and Lloyd-Jones M (2007). Glucocorticoid-induced osteoporosis: a systematic review and cost-utility analysis.*Health Technol Assess*, 11(7): iii-iv, ix-xi, 1-231.
- [121] Tascioglu F, Oner C, and Armagan O (2003). The effect of low-dose methotrexate on bone mineral density in patients with early rheumatoid arthritis.*Rheumatol Int*, 23(5): 231-5.
- [122] Caraballo P J, Heit J A, Atkinson E J, Silverstein M D, O'Fallon W M, Castro M R, and Melton L J, 3rd (1999). Long-term use of oral anticoagulants and the risk of fracture.*Arch Intern Med*, 159(15): 1750-6.
- [123] Miggiano G A, Gagliardi L (2005). Diet, nutrition and bone health.*La Clinica Terapeutica*, 156(1-2): 47-56.
- [124] Erdogan F, Nas K, Gur A (1998). Risk factors for postmenopausal osteoporosis in Turkey.*Osteoporos Int*, 8(3): 33.
- [125] Tastaban E (2008). Osteoporoz patogenezinde antioksidan enzimler ve RANKL.*ADÜ, Aydın*,
- [126] Senturk T (2002). Erkeklerde osteoporoz.*J Immunol Rheumatology*, 2(2): 132-37.
- [127] Pfeilschifter J, Koditz R, Pfohl M, and Schatz H (2002). Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause.*Endocr Rev*, 23(1): 90-119.

- [128] Manolagas S C and Jilka R L (1995). Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med*, 332(5): 305-11.
- [129] Tanakol R (2004). Fizyopatolojik etmenler. In: *Kutsal Y G, ed. Osteoporozda kemik kalitesi. Güneş kitabevi, Ankara: 3-71.*
- [130] Jevon M, Hirayama T, Brown M A, Wass J A, Sabokbar A, Ostelere S, and Athenasou N A (2003). Osteoclast formation from circulating precursors in osteoporosis. *Scand J Rheumatol*, 32(2): 95-100.
- [131] Canalis E (1983). The hormonal and local regulation of bone formation. *Endocr Rev*, 4(1): 62-77.
- [132] Allam E, Draz A, Hassan A, Neamat A, Galal M, and Windsor L J (2010). Expression of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand in ligature-induced periodontitis in osteoporotic and non-osteoporotic rats. *J Periodontal Res*, 45(1): 136-42.
- [133] Wactawski-Wende J (2001). Periodontal diseases and osteoporosis: association and mechanisms. *Ann Periodontol*, 6(1): 197-208.
- [134] Mohammad A R, Brunsvold M, and Bauer R (1996). The strength of association between systemic postmenopausal osteoporosis and periodontal disease. *Int J Prosthodont*, 9(5): 479-83.
- [135] Elders P J, Habets L L, Netelenbos J C, van der Linden L W, and van der Stelt P F (1992). The relation between periodontitis and systemic bone mass in women between 46 and 55 years of age. *J Clin Periodontol*, 19(7): 492-6.
- [136] Kribbs P J (1990). Comparison of mandibular bone in normal and osteoporotic women. *J Prosthet Dent*, 63(2): 218-22.
- [137] Krall E A, Garcia R I, and Dawson-Hughes B (1996). Increased risk of tooth loss is related to bone loss at the whole body, hip, and spine. *Calcif Tissue Int*, 59(6): 433-7.
- [138] Pilgram T K, Hildebolt C F, Dotson M, Cohen S C, Hauser J F, Kardaris E, and Civitelli R (2002). Relationships between clinical attachment level and spine and hip bone mineral density: data from healthy postmenopausal women. *J Periodontol*, 73(3): 298-301.
- [139] Grodstein F, Colditz G A, and Stampfer M J (1996). Post-menopausal hormone use and tooth loss: a prospective study. *J Am Dent Assoc*, 127(3): 370-7, quiz 392.
- [140] Kribbs P J, Chesnut C H, 3rd, Ott S M, and Kilcoyne R F (1990). Relationships between mandibular and skeletal bone in a population of normal women. *J Prosthet Dent*, 63(1): 86-9.
- [141] von Wowern N, Klausen B, and Kollerup G (1994). Osteoporosis: a risk factor in periodontal disease. *J Periodontol*, 65(12): 1134-8.
- [142] Kribbs P J, Chesnut C H, 3rd, Ott S M, and Kilcoyne R F (1989). Relationships between mandibular and skeletal bone in an osteoporotic population. *J Prosthet Dent*, 62(6): 703-7.
- [143] French D L, Muir J M, and Webber C E (2008). The ovariectomized, mature rat model of postmenopausal osteoporosis: an assessment of the bone sparing effects of curcumin. *Phytomedicine*, 15(12): 1069-78.
- [144] Miller S C, Bowman B M, and Jee W S (1995). Available animal models of osteopenia--small and large. *Bone*, 17(4 Suppl): 117S-123S.
- [145] Wronski T J, Cintron M, and Dann L M (1988). Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int*, 43(3): 179-83.

- [146] Wronski TJ D L a H S (1990). Time course of vertebral osteopenia in ovariectomized rats. *Bone* 1990, 10: 295-301.
- [147] Miyakoshi N, Sato K, Abe T, Tsuchida T, Tamura Y, and Kudo T (1999). Histomorphometric evaluation of the effects of ovariectomy on bone turnover in rat caudal vertebrae. *Calcif Tissue Int*, 64(4): 318-24.
- [148] Blair H C, Robinson L J, Huang C L, Sun L, Friedman P A, Schlesinger P H, and Zaidi M (2011). Calcium and bone disease. *Biofactors*, 37(3): 159-67.
- [149] Seto H, Aoki K, Kasugai S, and Ohya K (1999). Trabecular bone turnover, bone marrow cell development, and gene expression of bone matrix proteins after low calcium feeding in rats. *Bone*, 25(6): 687-95.
- [150] Gao X, Ma W, Dong H, Yong Z, and Su R (2014). Establishing a rapid animal model of osteoporosis with ovariectomy plus low calcium diet in rats. *Int J Clin Exp Pathol*, 7(8): 5123-8.
- [151] Shen V, Birchman R, Liang X G, Wu D D, Lindsay R, and Dempster D W (1997). Prednisolone alone, or in combination with estrogen or dietary calcium deficiency or immobilization, inhibits bone formation but does not induce bone loss in mature rats. *Bone*, 21(4): 345-51.
- [152] Nitta T, Fukushima T, Nakamuta H, and Koida M (1999). Glucocorticoid-induced secondary osteopenia in female rats: a time course study as compared with ovariectomy-induced osteopenia and response to salmon calcitonin. *Jpn J Pharmacol*, 79(3): 379-86.
- [153] Lind P M, Johansson S, Ronn M, and Melhus H (2006). Subclinical hypervitaminosis A in rat: measurements of bone mineral density (BMD) do not reveal adverse skeletal changes. *Chem Biol Interact*, 159(1): 73-80.
- [154] Fahmy S R, Soliman A M (2009). Oxidative stress as a risk factor of osteoporotic model induced by vitamin A in rats. *Aust J Basic*, 3(3): 1559-68.
- [155] Peng X, Jianfeng Y, Weizhang J, Qiankun C, Xio G (2005). The effect of osteoporotic model rats induced by retinoic acid. *Chin Int J Traumatol*: 1-6.
- [156] Frost H M (1983). The regional acceleratory phenomenon: a review. *Henry Ford Hosp Med J*, 31(1): 3-9.
- [157] Cavolina J M, Evans G L, Harris S A, Zhang M, Westerlind K C, and Turner R T (1997). The effects of orbital spaceflight on bone histomorphometry and messenger ribonucleic acid levels for bone matrix proteins and skeletal signaling peptides in ovariectomized growing rats. *Endocrinology*, 138(4): 1567-76.
- [158] Keleştimur H (1996). İnsanda Pineal Bezin Fonksiyonları. *Fırat Üniv Sağlık Bil Dergisi*, 10(1): 141-7.
- [159] Erlich S S and Apuzzo M L (1985). The pineal gland: anatomy, physiology, and clinical significance. *J Neurosurg*, 63(3): 321-41.
- [160] Lerner A B, Case J D, Takahashi Y, Lee T H, Mori W (1958). Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Amer Chem Soc*, 80(10): 2587.
- [161] Claustrat B, Brun J, and Chazot G (2005). The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med Rev*, 9(1): 11-24.
- [162] Reiter R J, Melchiorri D, Sewerynek E, Poeggeler B, Barlow-Walden L, Chuang J, Ortiz G G, and Acuna-Castroviejo D (1995). A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J Pineal Res*, 18(1): 1-11.
- [163] Macchi M M and Bruce J N (2004). Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front Neuroendocrinol*, 25(3-4): 177-95.
- [164] Cagnacci A (1996). Melatonin in relation to physiology in adult humans. *J Pineal Res*, 21(4): 200-13.

- [165] Rahman M K, Nagatsu T, Sakurai T, Hori S, Abe M, and Matsuda M (1982). Effect of pyridoxal phosphate deficiency on aromatic L-amino acid decarboxylase activity with L-DOPA and L-5-hydroxytryptophan as substrates in rats. *Jpn J Pharmacol*, 32(5): 803-11.
- [166] Bouchard S, Bousquet C, and Roberge A G (1981). Characteristics of dihydroxyphenylalanine/5-hydroxytryptophan decarboxylase activity in brain and liver of cat. *J Neurochem*, 37(3): 781-7.
- [167] Cardinali D P and Pevet P (1998). Basic aspects of melatonin action. *Sleep Med Rev*, 2(3): 175-90.
- [168] Reiter R J, Carneiro R C, and Oh C S (1997). Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Horm Metab Res*, 29(8): 363-72.
- [169] Özgüner F, Özçankaya R, Delibaş N, Koyu A, Çalışkan S (1995). Melatonin ve klinik önemi. *SDÜ Tıp Fak Derg*, 2(4): 1-6.
- [170] Lee P P, Shiu S Y, Chow P H, Pang S F (1995). Regional and diurnal studies of melatonin and melatonin binding sites in the duck gastro-intestinal tract. *Biol Signals*, 4(4): 212-24.
- [171] Reiter R J (1995). The pineal gland and melatonin in relation to aging: a summary of the theories and of the data. *Exp Gerontol*, 30(3-4): 199-212.
- [172] Siu A W, Reiter R J, To C H (1998). The efficacy of vitamin E and melatonin as antioxidants against lipid peroxidation in rat retinal homogenates. *J Pineal Res*, 24(4): 239-44.
- [173] Ebisawa T, Karne S, Lerner M R, and Reppert S M (1994). Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(13): 6133-7.
- [174] Reppert S M, Weaver D R, and Godson C (1996). Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. *Trends Pharmacol Sci*, 17(3): 100-2.
- [175] Dubocovich M L and Markowska M (2005). Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine*, 27(2): 101-10.
- [176] Song Y, Chan C W, Brown G M, Pang S F, and Silverman M (1997). Studies of the renal action of melatonin: evidence that the effects are mediated by 37 kDa receptors of the Mel1a subtype localized primarily to the basolateral membrane of the proximal tubule. *FASEB J*, 11(1): 93-100.
- [177] Reppert S M, Godson C, Mahle C D, Weaver D R, Slaugenhaupt S A, and Gusella J F (1995). Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(19): 8734-8.
- [178] Reppert S M, Weaver D R, Ebisawa T, Mahle C D, and Kolakowski L F, Jr. (1996). Cloning of a melatonin-related receptor from human pituitary. *FEBS Lett*, 386(2-3): 219-24.
- [179] Boutin J A, Audinot V, Ferry G, and Delagrangé P (2005). Molecular tools to study melatonin pathways and actions. *Trends Pharmacol Sci*, 26(8): 412-9.
- [180] Sugden D, Davidson K, Hough K A, and Teh M T (2004). Melatonin, melatonin receptors and melanophores: a moving story. *Pigment Cell Res*, 17(5): 454-60.
- [181] Sugden D and Chong N W (1991). Pharmacological identity of 2-[125I]iodomelatonin binding sites in chicken brain and sheep pars tuberalis. *Brain Res*, 539(1): 151-4.
- [182] Touitou Y (2001). Human aging and melatonin. Clinical relevance. *Exp Gerontol*, 36(7): 1083-100.

- [183] Gupta D, Riedel L, Frick H J, Attanasio A, Ranke M B (1983). Circulating melatonin in children: In relation to puberty, endocrine disorders functional tests and racial origin. *Neuroendocrinol Lett*, 5(2): 63-78.
- [184] Cornelissen G, Halberg F, Burioka N, Perfetto F, Tarquini R, and Bakken E E (2000). Do plasma melatonin concentrations decline with age? *Am J Med*, 109(4): 343-5.
- [185] Liebmann P M, Wolfler A, Felsner P, Hofer D, and Schauenstein K (1997). Melatonin and the immune system. *Int Arch Allergy Immunol*, 112(3): 203-11.
- [186] Cevat Y, Kader K (2004). Melatonin: karanlığın antioksidan gücü. *EÜ J Health Sci*, 13(2): 56-65.
- [187] Roth J A, Kim B G, Lin W L, and Cho M I (1999). Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. *J Biol Chem*, 274(31): 22041-7.
- [188] Rodriguez C, Mayo J C, Sainz R M, Antolin I, Herrera F, Martin V, and Reiter R J (2004). Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res*, 36(1): 1-9.
- [189] Reiter R J (1996). Functional aspects of the pineal hormone melatonin in combating cell and tissue damage induced by free radicals. *Eur J Endocrinol*, 134(4): 412-20.
- [190] Beyer C E, Steketee J D, and Saphier D (1998). Antioxidant properties of melatonin--an emerging mystery. *Biochem Pharmacol*, 56(10): 1265-72.
- [191] Reiter R J, Tan D X, Osuna C, and Gitto E (2000). Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review. *J Biomed Sci*, 7(6): 444-58.
- [192] Bettahi I, Guerrero J M, Reiter R J, and Osuna C (1998). Physiological concentrations of melatonin inhibit the norepinephrine-induced activation of prostaglandin E2 and cyclic AMP production in rat hypothalamus: a mechanism involving inhibition of nitric oxide synthase. *J Pineal Res*, 25(1): 34-40.
- [193] Miller A L (2005). Epidemiology, etiology, and natural treatment of seasonal affective disorder. *Altern Med Rev*, 10(1): 5-13.
- [194] Golden R N, Gaynes B N, Ekstrom R D, Hamer R M, Jacobsen F M, Suppes T, Wisner K L, and Nemeroff C B (2005). The efficacy of light therapy in the treatment of mood disorders: a review and meta-analysis of the evidence. *Am J Psychiatry*, 162(4): 656-62.
- [195] Commentz J C and Helmke K (1995). Precocious puberty and decreased melatonin secretion due to a hypothalamic hamartoma. *Horm Res*, 44(6): 271-5.
- [196] Voordouw B C, Euser R, Verdonk R E, Alberda B T, de Jong F H, Drogendijk A C, Fauser B C, and Cohen M (1992). Melatonin and melatonin-progestin combinations alter pituitary-ovarian function in women and can inhibit ovulation. *J Clin Endocrinol Metab*, 74(1): 108-17.
- [197] Maestroni G J (1995). T-helper-2 lymphocytes as a peripheral target of melatonin. *J Pineal Res*, 18(2): 84-9.
- [198] Yönel E E, Yaprak M, Yıldız Y (1996). Yüksek ve düşük doz eksojen melatoninin erkek ratlarda vücut ısısına etkileri. *TÜ Tıp Fak Derg*, 13(1,2): 11-4.
- [199] Lee Y M, Chen H R, Hsiao G, Sheu J R, Wang J J, and Yen M H (2002). Protective effects of melatonin on myocardial ischemia/reperfusion injury in vivo. *J Pineal Res*, 33(2): 72-80.
- [200] Bourne R S and Mills G H (2006). Melatonin: possible implications for the postoperative and critically ill patient. *Intensive Care Med*, 32(3): 371-9.
- [201] Cuzzocrea S and Reiter R J (2001). Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. *Eur J Pharmacol*, 426(1-2): 1-10.

- [202] Pozo D, Reiter R J, Calvo J R, and Guerrero J M (1997). Inhibition of cerebellar nitric oxide synthase and cyclic GMP production by melatonin via complex formation with calmodulin. *J Cell Biochem*, 65(3): 430-42.
- [203] Tomas-Zapico C and Coto-Montes A (2005). A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. *J Pineal Res*, 39(2): 99-104.
- [204] Kacmaz A, User E Y, Sehirli A O, Tilki M, Ozkan S, Sener G (2005). Protective effect of melatonin against ischemia/reperfusion-induced oxidative remote organ injury in the rat. *Surg Today*, 35(9): 744-50.
- [205] Kiss J, Banhegyi D, and Csaba G (1969). Endocrine regulation of blood calcium level. II. Relationship between the pineal body and the parathyroid glands. *Acta Med Acad Sci Hung*, 26(4): 363-70.
- [206] Ostrowska Z, Kos-Kudla B, Marek B, Kajdaniuk D, Staszewicz P, Szapska B, and Strzelczyk J (2002). The influence of pinealectomy and melatonin administration on the dynamic pattern of biochemical markers of bone metabolism in experimental osteoporosis in the rat. *Neuro Endocrinol Lett*, 23 Suppl 1: 104-9.
- [207] Bertl K, Schoiber A, Haririan H, Laky M, Steiner I, Rausch W D, Andrukhov O, and Rausch-Fan X (2013). Non-surgical periodontal therapy influences salivary melatonin levels. *Clin Oral Investig*, 17(4): 1219-25.
- [208] Forrest C M, Mackay G M, Stoy N, Stone T W, and Darlington L G (2007). Inflammatory status and kynurenine metabolism in rheumatoid arthritis treated with melatonin. *Br J Clin Pharmacol*, 64(4): 517-26.
- [209] Kedziora-Kornatowska K, Szewczyk-Golec K, Czuczejko J, Pawluk H, van Marke de Lumen K, Kozakiewicz M, Bartosz G, and Kedziora J (2008). Antioxidative effects of melatonin administration in elderly primary essential hypertension patients. *J Pineal Res*, 45(3): 312-7.
- [210] Kedziora-Kornatowska K, Szewczyk-Golec K, Kozakiewicz M, Pawluk H, Czuczejko J, Kornatowski T, Bartosz G, and Kedziora J (2009). Melatonin improves oxidative stress parameters measured in the blood of elderly type 2 diabetic patients. *J Pineal Res*, 46(3): 333-7.
- [211] Srinivasan V, Spence D W, Moscovitch A, Pandi-Perumal S R, Trakht I, Brown G M, and Cardinali D P (2010). Malaria: therapeutic implications of melatonin. *J Pineal Res*, 48(1): 1-8.
- [212] Wiechmann A F and O'Steen W K (1992). Melatonin increases photoreceptor susceptibility to light-induced damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 33(6): 1894-902.
- [213] Vijayalaxmi, Thomas C R, Jr., Reiter R J, and Herman T S (2002). Melatonin: from basic research to cancer treatment clinics. *J Clin Oncol*, 20(10): 2575-601.
- [214] Reiter R J (1993). Interactions of the pineal hormone melatonin with oxygen-centered free radicals: a brief review. *Braz J Med Biol Res*, 26(11): 1141-55.
- [215] 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): 729-36.
- [216] Balci Yuce H, Toker H, Ozdemir H, Goze F (2014). Effects of two experimental models of osteoporosis on alveolar bone: histopathologic and densitometric study. *J Oral Health Dent Manag*, 13(4): 915-20.
- [217] Kinoshita S, Ishikawa I, Noguchi T (1985). A color atlas of periodontics. *Ishiyaku Euro America Inc. St Louis Tokyo*: 9,10,28,51,52,59.

- [218] 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: 216-48.
- [219] Scannapieco F A (2005). Systemic effects of periodontal diseases.*Dent Clin North Am*, 49(3): 533-50, vi.
- [220] Aleksandre C (1995). Diagnosis and treatment of osteoporosis.*Curr Opin Rheumatol*, 7(3): 240-2.
- [221] Demirer S, Kara M I, Erciyas K, Ozdemir H, Ozer H, Ay S (2012). Effects of boric acid on experimental periodontitis and alveolar bone loss in rats.*Arch Oral Biol*, 57(1): 60-5.
- [222] Payne J B, Reinhardt R A, Nummikoski P V, and Patil K D (1999). Longitudinal alveolar bone loss in postmenopausal osteoporotic/osteopenic women.*Osteoporos Int*, 10(1): 34-40.
- [223] Weyant R J, Pearlstein M E, Churak A P, Forrest K, Famili P, and Cauley J A (1999). The association between osteopenia and periodontal attachment loss in older women.*J Periodontol*, 70(9): 982-91.
- [224] Bezerra M M, de Lima V, Alencar V B, Vieira I B, Brito G A, Ribeiro R A, and Rocha F A (2000). Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats.*J Periodontol*, 71(6): 1009-14.
- [225] 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): 123-9.
- [226] Kuhr A, Popa-Wagner A, Schmoll H, Schwahn C, and Kocher T (2004). Observations on experimental marginal periodontitis in rats.*J Periodontol Res*, 39(2): 101-6.
- [227] 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 Periodontol Res*, 13(1): 76-90.
- [228] Garcia-Maurino S, Gonzalez-Haba M G, Calvo J R, Rafii-El-Idrissi M, Sanchez-Margalet V, Goberna R, and Guerrero J M (1997). Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN-gamma production by human circulating CD4+ cells: a possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes.*J Immunol*, 159(2): 574-81.
- [229] Reiter R J (2004). Mechanisms of cancer inhibition by melatonin.*J Pineal Res*, 37(3): 213-4.
- [230] MacFarlane G D, Herzberg M C, Wolff L F, and Hardie N A (1992). Refractory periodontitis associated with abnormal polymorphonuclear leukocyte phagocytosis and cigarette smoking.*J Periodontol*, 63(11): 908-13.
- [231] Ekuni D, Tomofuji T, Tamaki N, Sanbe T, Azuma T, Yamanaka R, Yamamoto T, and Watanabe T (2008). Mechanical stimulation of gingiva reduces plasma 8-OHdG level in rat periodontitis.*Arch Oral Biol*, 53(4): 324-9.
- [232] Reiter R J (1991). Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions.*Endocr Rev*, 12(2): 151-80.
- [233] Streckfus C F, Johnson R B, Nick T, Tsao A, and Tucci M (1997). Comparison of alveolar bone loss, alveolar bone density and second metacarpal bone density, salivary and gingival crevicular fluid interleukin-6 concentrations in healthy premenopausal and postmenopausal women on estrogen therapy.*J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 52(6): M343-51.

- [234] Bashir A, Mak Y T, Sankaralingam S, Cheung J, McGowan N W, Grigoriadis A E, Fogelman I, and Hampson G (2005). Changes in RANKL/OPG/RANK gene expression in peripheral mononuclear cells following treatment with estrogen or raloxifene. *Steroids*, 70(13): 847-55.
- [235] Miyazaki T, Matsunaga T, Miyazaki S, Hokari S, and Komoda T (2004). Changes in receptor activator of nuclear factor-kappaB, and its ligand, osteoprotegerin, bone-type alkaline phosphatase, and tartrate-resistant acid phosphatase in ovariectomized rats. *J Cell Biochem*, 93(3): 503-12.
- [236] Cappellen D, Luong-Nguyen N H, Bongiovanni S, Grenet O, Wanke C, and Susa M (2002). Transcriptional program of mouse osteoclast differentiation governed by the macrophage colony-stimulating factor and the ligand for the receptor activator of NFkappa B. *J Biol Chem*, 277(24): 21971-82.
- [237] Takayanagi H (2005). Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. *J Periodontol Res*, 40(4): 287-93.
- [238] Schwartz Z, Goultchin J, Dean D D, and Boyan B D (1997). Mechanisms of alveolar bone destruction in periodontitis. *Periodontol 2000*, 14: 158-72.
- [239] 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): 370-6.
- [240] Cutando A, Lopez-Valverde A, de Diego R G, de Vicente J, Reiter R, Fernandez M H, and Ferrera M J (2014). Effect of topical application of melatonin to the gingiva on salivary osteoprotegerin, RANKL and melatonin levels in patients with diabetes and periodontal disease. *Odontology*, 102(2): 290-6.
- [241] Cobo-Vazquez C, Fernandez-Tresguerres I, Ortega-Aranegui R, and Lopez-Quiles J (2014). Effects of local melatonin application on post-extraction sockets after third molar surgery. A pilot study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 19(6): 628-33.
- [242] Luo K, Ma S, Guo J, Huang Y, Yan F, and Xiao Y (2014). Association between postmenopausal osteoporosis and experimental periodontitis. *Biomed Res Int*, 2014: 316134.
- [243] Amadei S U, Souza D M, Brandao A A, and Rocha R F (2011). Influence of different durations of estrogen deficiency on alveolar bone loss in rats. *Braz Oral Res*, 25(6): 538-43.
- [244] Duarte P M, Goncalves P F, Sallum A W, Sallum E A, Casati M Z, and Humberto Nociti F, Jr. (2004). Effect of an estrogen-deficient state and its therapy on bone loss resulting from an experimental periodontitis in rats. *J Periodontol Res*, 39(2): 107-10.
- [245] Anbinder A L, Prado Mde A, Spalding M, Balducci I, Carvalho Y R, da Rocha R F (2006). Estrogen deficiency and periodontal condition in rats: a radiographic and macroscopic study. *Braz Dent J*, 17(3): 201-7.
- [246] Uslu S, Uysal A, Oktem G, Yurtseven M, Tanyalcin T, and Basdemir G (2007). Constructive effect of exogenous melatonin against osteoporosis after ovariectomy in rats. *Anal Quant Cytol Histol*, 29(5): 317-25.
- [247] Satomura K, Tobiume S, Tokuyama R, Yamasaki Y, Kudoh K, Maeda E, and Nagayama M (2007). Melatonin at pharmacological doses enhances human osteoblastic differentiation in vitro and promotes mouse cortical bone formation in vivo. *J Pineal Res*, 42(3): 231-9.

- [248] Ladizesky M G, Cutrera R A, Boggio V, Somoza J, Centrella J M, Mautalen C, and Cardinali D P (2001). Effect of melatonin on bone metabolism in ovariectomized rats. *Life Sci*, 70(5): 557-65.
- [249] Histing T, Anton C, Scheuer C, Garcia P, Holstein J H, Klein M, Matthys R, Pohlemann T, and Menger M D (2012). Melatonin impairs fracture healing by suppressing RANKL-mediated bone remodeling. *J Surg Res*, 173(1): 83-90.
- [250] Sandyk R, Anastasiadis P G, Anninos P A, and Tsagas N (1992). Is postmenopausal osteoporosis related to pineal gland functions? *Int J Neurosci*, 62(3-4): 215-25.
- [251] Cohen M, van Heusden A M, Verdok H E R, Wijnhamer P (1993). Melatonin/nortestosterone contraception. In: *Touitou Y, Arendt J, Pevet P (eds.) Melatonin and the pineal gland—from basic science to clinical application. Elsevier/North Holland, Amsterdam: 339-45.*

T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

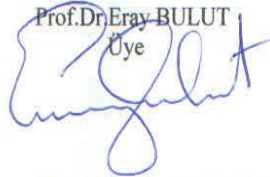
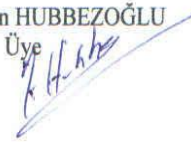
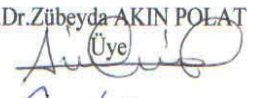
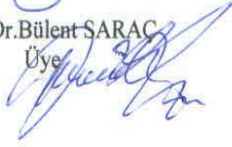
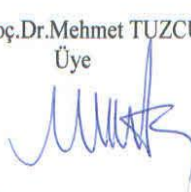
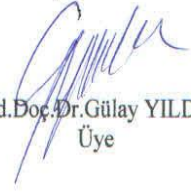


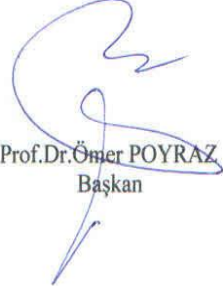
Sayı : B.30.2.CUM.0.01.00.00-50/ 48
Konu : Etik Kurul Kararı hk.

06.06.2013

Sayın
Yrd.Doç.Hakan ÖZDEMİR
Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı

Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 06.06.2013 tarihinde Prof.Dr.Ömer POYRAZ başkanlığında toplanarak aşağıdaki kararı almıştır.

Yrd.Doç.Hakan ÖZDEMİR'in yürütücülüğünü yapmış olduğu 31.05.2013 tarih ve 377 sayılı **"Osteoporotik ratlarda oluşturulan deneysel periodontitis modelinde kemik rezorpsiyonu üzerine sistemik olarak alınan melatoninin etkisinin histopatolojik ve histomorfometrik açıdan araştırılması"** isimli Doktora Tezi Projesi Etik Kurulumuzca kabul edilmiştir.

Prof.Dr.Eray BULUT Üye 	Doç.Dr.İhsan HUBBEZOĞLU Üye 	Doç.Dr.Zübeyda AKIN POLAT Üye 
Doç.Dr.Bülent SARAC Üye 	Doç.Dr.Mehmet TUZCU Üye 	Yrd.Doç.Dr.Gülây YILDIRIM Üye 
Yrd.Doç.Dr.Çağrı Çağlar SİNMEZ Üye 	Uz.Vet.Hek.Yücel YALMAN Üye – Başkanvekili 	
Semiha EKİNCİ Sivil Üye	Prof.Dr.Ömer POYRAZ Başkan 	Turhan DUYMUŞ Sivil Üye

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel bilgiler

Adı Soyadı	Suat Serhan ALTINTEPE DOĞAN
Doğum Yeri ve Tarihi	Balıkesir-1984
Medeni Hali	Evli
Yabancı Dil	İngilizce
İletişim Adresi	Cumhuriyet Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Periodontoloji Anabilim Dalı, 58140-Sivas
E-posta Adresi	suatserhanaltintepe@hotmail.com

Eğitim ve Akademik Durumu

Lise	Sırrı Yırcalı Anadolu Lisesi, 2003
Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, 2009
Doktora/Uzmanlık	Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı, 2015