



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

**RATLARDA OLUŞTURULAN DENEYSEL PERİODONTİTİS MODELİNDE
KEMİK REZORPSİYONU VE GİNGİVAL ENFLAMASYON ÜZERİNDE
SİSTEMİK VE LOKAL OLARAK UYGULANAN HÜMİK ASİDİN ETKİSİNİN
HİSTOPATOLOJİK VE HİSTOMORFOMETRİK AÇIDAN ARAŞTIRILMASI**

METİN ÇALIŞIR

**DOKTORA TEZİ
PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI**

2013

CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RATLARDA OLUŞTURULAN DENEYSEL PERİODONTİTİS MODELİNDE KEMİK
REZORPSİYONU VE GİNGİVAL ENFLAMASYON ÜZERİNDE SİSTEMİK VE
LOKAL OLARAK UYGULANAN HÜMİK ASİDİN ETKİSİNİN HİSTOPATOLOJİK
VE HİSTOMORFOMETRİK AÇIDAN ARAŞTIRILMASI

METİN ÇALIŞIR

DOKTORA TEZİ

PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

YRD. DOÇ. DR. AYSUN AKPINAR

SİVAS

2013

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. Yasin ÇİÇEK	
Üye	Doç. Dr. Hülya TOKER	
Üye	Doç. Dr. Hakan DEVELİOĞLU	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Aysun AKPINAR	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Kerem Engin AKPINAR	

ONAY

Bu tez çalışması 22/02/2013 tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ömer POYRAZ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 24.09.2008 tarihli ve 007 sayılı toplantısında kabul edilen Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzu adlı yönergeye göre hazırlanmıştır.

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı ratlarda oluşturulan deneysel periodontitis modelinde sistemik ve lokal olarak uygulanan hümik asidin alveoler kemik kaybı ve dişeti enflamasyonu üzerine etkilerinin biyokimyasal, histopatolojik ve morfometrik açıdan araştırılmasıdır.

Materyal metot: 62 adet Wistar rat 8 deney grubuna ayrıldı; ligatürsüz kontrol (K, n=6) grubu; ligatürlü kontrol (LK, n=8) grubu; ligatür + Lokal-20 mg/kg hümik asit (L-20, n=8) grubu; ligatür + Lokal-80 mg/kg hümik asit (L-80, n=8) grubu; ligatür + Lokal-150 mg/kg hümik asit (L-150, n=8) grubu; ligatür + Sistemik-20 mg/kg hümik asit (S-20, n=8) grubu; ligatür + Sistemik-80 mg/kg hümik asit (S-80, n=8) grubu; ligatür + Sistemik-150 mg/kg hümik asit (S-150, n=8) grubu. Çalışma gruplarında hümik asit miktarları 15 gün boyunca uygulandı. Deneysel periodontitis oluşturmak amacıyla ratların sağ alt birinci molar dişlerin gingival marjinlerine 4/0 ipek ligatürler yerleştirildi. 15 günün sonunda ratlar sakrifiye edildi. Alveoler kemik kaybı stereomikroskopta mine-sement sınırı ile alveoler kret tepesi arasındaki mesafe olarak ölçüldü (25x). Dişeti homojenatlarında ve serumda IL-1 β ve IL-10 seviyeleri ELISA ile belirlendi. Histopatolojik olarak enflamatuvar hücre infiltrasyonu, fibrozis, osteoklast sayısı ve osteoblastik aktivite değerlendirildi.

Bulgular: 15 günün sonunda LK grubunda alveoler kemik kaybı K, L-20, L-150, S-80 ve S-150 gruplarına oranla anlamlı düzeyde yüksekti ($p<0.05$). S-80 grubunda alveoler kemik kaybı LK, L-20, L-80 ve S-20 gruplarına oranla anlamlı düzeyde düşük bulundu ($p<0.05$). S-80 ve S-150 gruplarında osteoblastik aktivite diğer tüm gruplara oranla anlamlı düzeyde yüksekti ($p<0.05$). LK grubunda osteoklast sayısı L-20, L-150, S-80 ve S-150 gruplarına göre anlamlı düzeyde yüksekti ($p<0.05$). En yüksek fibrozis değeri L-80 grubunda tespit edildi. Ayrıca LK, L-80 ve S-20 gruplarında enflamatuvar hücre infiltratı diğer gruplardan anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p<0.05$). S-80 grubunda serum ve dişeti homojenatı IL-10 düzeyleri en yüksek oranda tespit edildi. LK grubunda serum ve dişeti homojenatı IL-1 β düzeyleri K, L-20, L-150, S-20, S-80 ve S-150 gruplarından anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p<0.05$).

Sonuçlar: Bu çalışmanın sınırları dahilinde sistemik olarak alınan 80 mg/kg hümik asidin rat modelinde alveoler kemik kaybını azaltabileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Deneysel periodontitis, Alveoler kemik kaybı, Enflamatuvar sitokinler, Hümik asit.

ABSTRACT

Aim: The purpose of this study was to evaluate the biochemical, morphometric and histopathological changes associated with experimental periodontitis in rats in response to systemic and local administration of humic acid.

Methods: 62 Wistar rats were divided into 8 experimental groups: non-ligated (K, n=6) group; ligature only (LK, n=8) group; ligature + local administration of humic acid (20, 80 and 150 mg/kg body weight per day for 15 days, respectively) (L-20 n=8, L-80 n=8 and L-150 n=8 groups); ligature + systemic administration of humic acid (20, 80 and 150 mg/kg body weight per day for 15 days, respectively) (S-20, S-80 and S-150 groups). 4/0 silk ligatures were placed at the gingival margin of lower first molars of mandibular quadrant. The animals were sacrificed at the end of 15 days. Changes in alveolar bone levels were clinically measured as the distance from cemento-enamel junction to the alveolar bone crest with a stereomicroscope (x25). Tissues were histopathologically examined to assess the differences of fibrosis, osteoclast numbers, osteoblastic activity and inflammatory cell infiltration among the study groups. ELISA IL-1 β and IL-10 levels in serum and gingival homogenates were evaluated.

Results: At the end of 15 days, the alveolar bone loss was significantly higher in the LK group compared to the K, L-20, L-150, S-80 and S-150 groups ($p < 0.05$). Also, the alveolar bone loss in the S-80 group was significantly lower than the LK, L-20, L-80 and S-20 groups ($p < 0.05$). The osteoblastic activity in the S-80 and S-150 groups were significantly higher than the other groups ($p < 0.05$). The osteoclast number in the LK group was significantly higher than the L-20, L-150, S-80 ve S-150 groups ($p < 0.05$). The highest fibrosis level was determined in the S-80 group. Inflammatory cell infiltration was significantly higher in LK, L-80 and S-20 groups than the other groups ($p < 0.05$). The highest serum and gingival homogenate IL-10 levels were determined in the S-80 group ($p < 0.05$). The serum and gingival homogenate IL-1 β levels in LK group were significantly higher than the K, L-20, L-150, S-20, S-80 and S-150 groups ($p < 0.05$).

Conclusion: Within the limits of this study, it can be suggested that humic acid, when administered systemically 80 mg/kg dose, may prevent alveolar bone loss in the rat model.

Key words: Experimental periodontitis, Alveolar bone loss, Inflammatory cytokines, Humic acid.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca desteklerini benden esirgemeyen sevgili danıőman hocam Yrd. Doç. Dr. Aysun AKPINAR'a;

Doktora eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan sevgili hocam Doç. Dr. Hülya TOKER'e;

Doktora eğitimim süresince bilgilerini benimle paylaşan sevgili hocalarım Yrd. Doç. Dr. Vildan BOSTANCI, Yrd. Doç. Dr. Hakan ÖZDEMİR ve Doç. Dr. Hakan DEVELİOğLU'na;

Tez ęalıőmamın deneysel aőamalarında yardımlarını sunan sayın hocalarım Prof. Dr. Fahrettin GÖZE, Prof. Dr. Ömer POYRAZ, Doę. Dr. Yavuz SİLİğ ve Yrd. Doę. Dr. Ziyneť ÇINAR'a;

Tez ęalıőmamı maddi olarak destekleyen Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı'na;

Doktoram süresince bana sıcak ve samimi bir ortam sunan Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji ailesi ve değerli dostlarıma;

Varlığı ile bana her zaman güç veren ve yaőamı benimle paylaşan sevgili eőim Gülten FIRAT ÇALIşIR'a;

Beni yetiőtiren, bugün olduğum insan olmamı sağlayan sevgili annem ve babama;

Akademisyenlik yolunda bana ışık tutan ve örnek aldığım sevgili ablam Yrd. Doç. Dr. Deniz TEKİN, sevgili abim Prof. Dr. Bayram TEKİN ve eğlence kaynağım biricik yeğenim Elif Ada TEKİN'e;

Destekleri ile hep yanımda olan sevgili dostlarım Tayfun SÖNMEZ ve Ümit KARAKUő'a;

Teőekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Periodontal Hastalık.....	5
2.1.1. Biyofilm Tabakası.....	6
2.1.2. Mikrobiyal Dental Plak (MDP).....	6
2.1.3. Periodontal Hastalığın Patogenezi.....	7
2.1.4. Deneysel Periodontitis Modelleri.....	8
2.1.5. Sitokinler.....	10
2.1.5.1. IL-1 β	13
2.1.5.2. IL-10.....	15
2.2. Konak Modülasyonu.....	16
2.3. Hümik Asit.....	18
2.3.1. Yapısı.....	19
2.3.2. Sağlık Alanında Uygulamaları.....	22
2.3.2.1. Kemik Metabolizması Üzerine Etkileri.....	22
2.3.2.2. Antiviral Aktivitesi.....	22
2.3.2.3. Anti-Enflamatuvar Etkileri.....	23
2.3.2.4. Kan Parametreleri Üzerine Etkileri.....	24
2.3.2.5. Mineral Transferi Üzerine Etkileri.....	24
2.3.2.6. İmmün Sistem Üzerine Etkileri.....	24
2.3.3. Hümik Asit İçeriği.....	25
2.3.4. Sitotoksiste.....	26
3.MATERYAL METOT.....	27
3.1. Çalışma Grupları.....	27
3.2. Çalışma Prosedürü.....	28
3.2.1. Deneysel Periodontitis Oluşturulması.....	28
3.2.2. Hümik Asit Uygulaması.....	28
3.2.3. Sakrifikasyon.....	28
3.2.4. Ratlardan Serum Elde Edilmesi.....	29
3.2.5. Dişeti Biyopsilerinin Biyokimyasal Analizi.....	29
3.2.6. Morfometrik Değerlendirme.....	30
3.2.7. Histopatolojik İşlemler.....	30
3.2.8. IL-10 ELISA Kitinin Hazırlanması.....	31
3.2.9. IL-1 β ELISA Kitinin Hazırlanması.....	32
3.2.10. İstatistiksel Değerlendirme.....	34

4.BULGULAR.....	35
4.1. Morfometrik Ölçümler	36
4.2. Serum ve Dişeti Homojenati IL-10 ve IL-1 β Değerleri.....	39
4.3. Histopatolojik Değerlendirme	43
4.3.1. Osteoblastik Aktivite.....	43
4.3.2. Osteoklast Sayısı.....	45
4.3.3. Fibrozis.....	47
4.3.4. Enflamatuvar Hücre İnfiltratı.....	49
5.TARTIŞMA.....	59
Sonuç ve Öneriler	67
KAYNAKÇA.....	68
ÖZGEÇMİŞ	81

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: *Bakteri ve konak yanıtı arasındaki etkileşim sonrasında artmış doku yıkımının şematik gösterimi.*

Şekil 2: *Sitokinlerin immün yanıtta etkilerinin şematik gösterimi.*

Şekil 3: *Hüyük maddelerin basit oluşum şeması.*

Şekil 4: *Oksidize hüyük asidin kimyasal yapısı.*

Şekil 5: *Uluslararası Hüyük Maddeleri Derneği (IHSS) tarafından tarif edilen ekstraksiyon metodu.*

Şekil 6: *Hüyük maddelerin doğada buldukları renkleri.*

Şekil 7: *Ratların sağ mandibular birinci molar dişlerine yerleştirilmiş olan 4/0 ipek ligatürün görüntüsü.*

Şekil 8: *Gruplara ait alt sağ birinci molar dişlerin stereomikroskop görüntüsü (x25).*

Şekil 9: *Gruplara ait alveoler kemik kaybı ortalamaları.*

Şekil 10: *Gruplara ait osteoblastik aktivite dağılımı (%).*

Şekil 11: *Gruplara ait ortalama osteoklast sayısı değeri.*

Şekil 12: *Gruplara ait ortalama fibrozis değeri (%).*

Şekil 13: *Gruplara ait enflamatuvar hücre infiltratı dağılımı (%).*

Şekil 14: *Kontrol Grubu'na ait histolojik kesitler.*

Şekil 15: *Ligatürlü Kontrol Grubu'na ait histolojik kesitler.*

Şekil 16: *Lokal-20 mg/kg Grubu'na ait histolojik kesitler.*

Şekil 17: *Lokal-80 mg/kg Grubu'na ait histolojik kesitler.*

Şekil 18: *Lokal-150 mg/kg Grubu'na ait histolojik kesitler.*

Şekil 19: *Sistemik-20 mg/kg Grubu'na ait histolojik kesitler.*

Şekil 20: *Sistemik-80 mg/kg Grubu'na ait histolojik kesitler.*

Şekil 21: *Sistemik-150 mg/kg Grubu'na ait histolojik kesitler.*

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1: *Gruplara ait alveoler kemik kaybı ortalamaları ve ortanca değerleri.*

Çizelge 2: *Gruplara ait Serum IL-10 düzeyleri.*

Çizelge 3: *Gruplara ait Dişeti Homojenati IL-10 düzeyleri.*

Çizelge 4: *Gruplara ait Serum IL-1 β düzeyleri.*

Çizelge 5: *Gruplara ait Dişeti Homojenati IL-1 β düzeyleri.*

Çizelge 6: *Gruplara ait osteoblastik aktivite değerleri.*

Çizelge 7: *Gruplara ait ortalama osteoklast sayısı.*

Çizelge 8: *Gruplara ait ortalama fibrozis değerleri.*

Çizelge 9: *Gruplara ait enflamatuvar hücre infiltratı değerleri.*

KISALTMALAR DİZİNİ

MDP: Mikrobiyal dental plak

IL: İnterlökin

TNF: Tümör nekroz faktör

IFN: İnterferon

PGE₂: Prostaglandin E₂

MMP: Matriks metalloproteinaz

Th-2: T helper-2 hücresi

Th-1: T helper-1 hücresi

RANK: Nükleer faktör kappa B'nin reseptör aktivatörü

NSAI: Non-steroidal anti-enflamatuvar

COX: Siklooksijenaz

HA: Hüyük asit

FA: Fulvik asit

HU: Humin

MPO: Myeloperoksidaz

ECM: Ekstrasellüler matriks

TIMP: Metalloproteinaz doku inhibitörü

RANKL: Nükleer faktör kappa B'nin reseptör aktivatörü bağlayıcısı

OPG: Osteoprotegrin

CFU-GM: Granüositler ve makrofajlar için koloni şekillendirici eleman

M-CSF: Makrofaj koloni stimüle edici faktör

HSV-1: Herpes simpleks tip-1 virüs

HIV: İnsan immün yetmezlik virüs

CMV: Sitomegalovirüs

ICAM-1: İntrasellüler adezyon molekül-1

VCAM-1: Vasküler adezyon molekül-1

RBC: Kırmızı kan hücreleri

CEJ: Mine-sement sınırı

ABC: Alveoler kemik kreti

1. GİRİŞ

Periodontitis birden fazla periodontopatojene karşı konak enflamatuvar ve immünolojik reaksiyonlarının oluşturduğu, bağ dokusu ataşmanı ve alveoler kemik kaybıyla karakterize diş destek dokularının bir hastalığıdır [1]. Bu hastalıklar genellikle birbirini takip eden aktif ve pasif dönemlerle karakterize dönemsel kronik hastalıklardır [2, 3].

Periodontitisin meydana gelmesinde değişik etkenlerden söz edilmesine rağmen primer etiyolojik faktör mikrobiyal dental plak (MDP) olarak tanımlanmıştır [4, 5]. Fakat hastalığın patogenezi açıklamada MDP tek başına yeterli değildir. Hastalığın gelişebilmesi ve ilerleyebilmesi için bakteriler ve konak savunma mekanizmaları arasında bir takım etkileşimlerin olduğu düşünülmektedir. Bakteri ve ürünleri konak dokularına doğrudan veya enflamatuvar cevaba yol açarak dolaylı olarak zarar verebilir [4]. Periodontopatojenlere karşı konakta oluşan enflamatuvar mediatör süreci devam ederse konak dokusunda hasar meydana gelir [6]. Periodontopatojenlerin hastalık oluşturabilmesi için periodontal dokularda belli bir miktarda bulunmaları ve hastalığa sebep olabilecek patojenik faktörlere sahip olmaları gerekmektedir [7]. Enflamasyon sürecinde kemik kaybı olup olmayacağı dişetindeki enflamatuvar belirleyicilerin anlamlı düzeylere ulaşmasına ve bu belirleyicilerin alveol kemiğe ulaşabilecek mesafede dişeti dokularına penetre olmasına bağlıdır. Bu belirleyicilerin en önemlilerinden biri sitokinlerdir. İnterlökin (IL)-1, IL-6, IL-11, IL-17 ve Tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α) gibi pro-enflamatuvar sitokinler kritik konsantrasyonlara ulaşarak alveoler kemik yıkımını başlatır. Diğer yandan anti-enflamatuvar özellikleri bilinen IL-4, IL-10, IL-12, IL-13, IL-18, İnterferon-beta (IFN- β) ve İnterferon-gama (IFN- γ) gibi sitokinler kemik yıkımını baskılayarak tam tersi etki gösterirler [8].

Sitokinler hücreler arasında iletişimi sağlayan ve bağışık yanıtı düzenleyen hücrelerce salınan hormon benzeri aracı maddelerdir [9]. Peptit ya da glikoprotein yapısında çözünebilen mediatörler olan sitokinler, etkilerini salındığı hücrelerde veya ilgili hücrelerin yakınında gösterirler. Enflamatuvar olaylar esnasında meydana gelir ve ortama salınırlar. Sonrasında aynı ya da daha farklı bir hücre reseptörüne bağlanarak etki gösterirler [10]. Yapılan birçok çalışmada periodontopatojenik bakteriler ve ürünlerine karşı farklı konak

hücrelerinin sitokin salgıladığı gösterilmiştir. Bu sitokinler periodonsiyumda enflamatuvar yanıtı başlatmak ve sürdürmekle görevlidir [11-13]. Yapılan çalışmalar sonucunda sitokinler ve periodontal doku kaybı arasında bir neden-sonuç ilişkisi olduğu gösterilmiştir [14, 15].

IL-1 enfeksiyon alanına hücrelerin toplanmasını sağlayan pro-enflamatuvar bir sitokindir ve kemik yıkım sürecini ilerletir [16]. IL-1 β , IL-1'in periodontal dokularda bulunan dominant formu olup başlıca makrofajlardan salgınır [17]. Artmış IL-1 β düzeyi periodontitis hastalarında enflamasyonlu dişeti dokusuyla ilişkili olduğu bulunmuştur [18].

IL-10 başlıca T helper-2 (Th-2) lenfositleri tarafından üretilir ve T helper-1 (Th-1) klonlarını aktive ederek sitokin üretimini inhibe eder [19]. IL-10'un birçok deneysel çalışmada farklı hücre tipleri için anti-enflamatuvar etkisi ve periodontal hastalıkta immün yanıt üzerinde düzenleyici etkisi gösterilmiştir [20, 21].

Periodontal doku yıkımı periodontopatojen bakterilerin varlığı ve bunlara karşı oluşan konak yanıtı sonucunda oluşur. Bu yanıt çevresel (sigara kullanımı gibi), kazanılmış (sistemik hastalıklar) ve genetik risk faktörlerinden etkilenir [22]. Periodontal dokuların yıkımı konak yanıtıyla doğrudan bağlantılı olduğu için kronik periodontitisin tedavisinde anti-bakteriyel uygulamalara ek olarak konak yanıtını modüle etmeye yarayan terapotik uygulamalar faydalı olabilir. Konak modülasyonunu sağlamak için üç potansiyel uygulama olduğu bildirilir. Bunlar [23];

1. Antiproteinazlarla matris metalloproteinaz (MMP) inhibisyonu
2. Anti-enflamatuvar ilaçlarla prostaglandinlerin ve pro-enflamatuvar sitokinlerin üretiminin engellenmesi
3. Kemik koruyucu ajanlarla osteoklast aktivasyonunun inhibe edilmesi

Periodontal dokuların yıkımını önlemek için farklı maddelerin kullanımına ilişkin çalışmaların sayısı gün geçtikçe artmaktadır [24-28].

Periodontal bağ dokusu kollajenazlar ve jelatinazlar gibi bir dizi MMP'lar tarafından yıkıma uğratılır. Bu enzimler dokuların remodelasyonunda önemli rol oynarlar. Aktiviteleri bazı spesifik ve non-spesifik inhibitörler ile düzenlenir [29]. Golub ve ark. [30]

tetrasiklinlerin konak kaynaklı MMP'ların etkilerini direkt bloke edebildiğini göstermişlerdir. Bu sonuç tetrasiklinlerin bağ dokusu yıkımıyla karakterize çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanımını gündeme getirmiştir.

Periodontitiste görülen alveoler kemik kaybı osteoklastik aktivitenin bir sonucudur. Osteoporözün tedavisinde sıkça kullanılan bifosfonat ilaçlar etkilerini osteoklastların aktivitesini direkt bloke ederek gösterirler. Bifosfonat türevlerinden bir tanesi olan alendronat maymunlarda ligatürle oluşturulan periodontitis modelinde periodontal kemik kaybını önemli oranda azaltmıştır [31].

Araşidonik asit metabolitleri kronik periodontitis gibi çeşitli kemik yıkım süreçlerinde rol oynayan pro-enflamatuvar mediatörlerdir [32]. Bu mediatörler aspirin, ibuprofen ve naproksen gibi ilaçları içeren non-steroidal anti-enflamatuvar ilaçlar (NSAI ilaçlar) tarafından inhibe edilebilir. NSAI ilaçlar analjezik, anti-platelet ve anti-trombositik etkilerinin yanında siklooksijenaz (COX) enzim inhibisyonunu da sağlar. Böylece araşidonik asit metabolitlerinin üretimini engeller. NSAI ilaçların kullanımı sonucu pro-enflamatuvar mediatör düzeylerinin azalması kronik periodontitiste oluşan konakla ilişkili alveoler kemik yıkımını azaltabilir [23].

Hümik asitlerin araşidonik asit metabolitlerinin üretimini inhibe edebildiği gösterilmiştir [33]. Hümik asitler anti-enflamatuvar etkilerini çeşitli yollarla gösterir [34, 35]. Araşidonik asit metabolitlerinin üretiminin inhibisyonu bu yollardan bir tanesidir [33]. Ayrıca, hümik asitler anti-enflamatuvar [36], anti-viral [36], anti-bakteriyel [37], anti-alerjik [37], anti-ülserojenik [37] vs. özellikleri ile tıpta yaygın olarak çalışma alanı bulmuşlardır. Fakat periodontal dokularda daha önce çalışılmamış olup çalışmamız diş hekimliği alanında yapılan ilk deneysel çalışmadır.

Hümik asitler doğada yaygın bulunan organik karbon formlarıdır [38]. Diğer bir ifadeyle hümikli yapılar organik maddelerin kabasını oluşturur. Toprak, linyit, turba, kanalizasyon suları, kaynak suları ve çökeltilerinden oluşan organik maddelerin çoğunu temsil eder. Hümik maddeler temel olarak üçe ayrılır: Fulvik asitler (FA), hümik asitler (HA) ve Humin (HU). Hümik asitler ve fulvik asitler alkali ortamda çözünen humus yapılarını temsil ederken humin çözünmeyen tortuyu temsil eder. Hümik maddelerinin en

önemli parçalarından biri hümik asitlerdir [39]. Doğal olarak meydana gelen hümik asitler bütün topraklarda ve su yüzeylerinde olmak üzere doğada her yerde bulunan kahverengisiyah renkli polimerik organik asitlerdir [40]. Çalışmamızda turbadan elde edilen hümik asit kullanıldı. Turba ölü bataklık bitkilerinin humifikasyonu sonucu oluşan organik toprak şeklidir. Turbanın organik kısmı %90 oranında humin, hümik ve fulvik asit (%40'dan fazla), lignin, polisakkaritler, lipidler, pektinler, hemisellülöz ve sellülöz içerir [41]. Turba yüzyıllar boyunca tıp alanında kullanılmıştır. Turba tedavisinin uygulandığı bazı endikasyonlar; dejeneratif ve deforme artrozlar, Gut hastalığı, osteoporöz, spondilopatiler, kas romatizması, romatoid artritler, kronik enflamatuvar hastalıklar, hormonal dengesizlikler, bel ağrısı, kronik egzema, nörodermatit ve sedef hastalığıdır. Hümik asitler kan dolaşımını arttırarak rejenerasyon süresini hızlandırır [36].

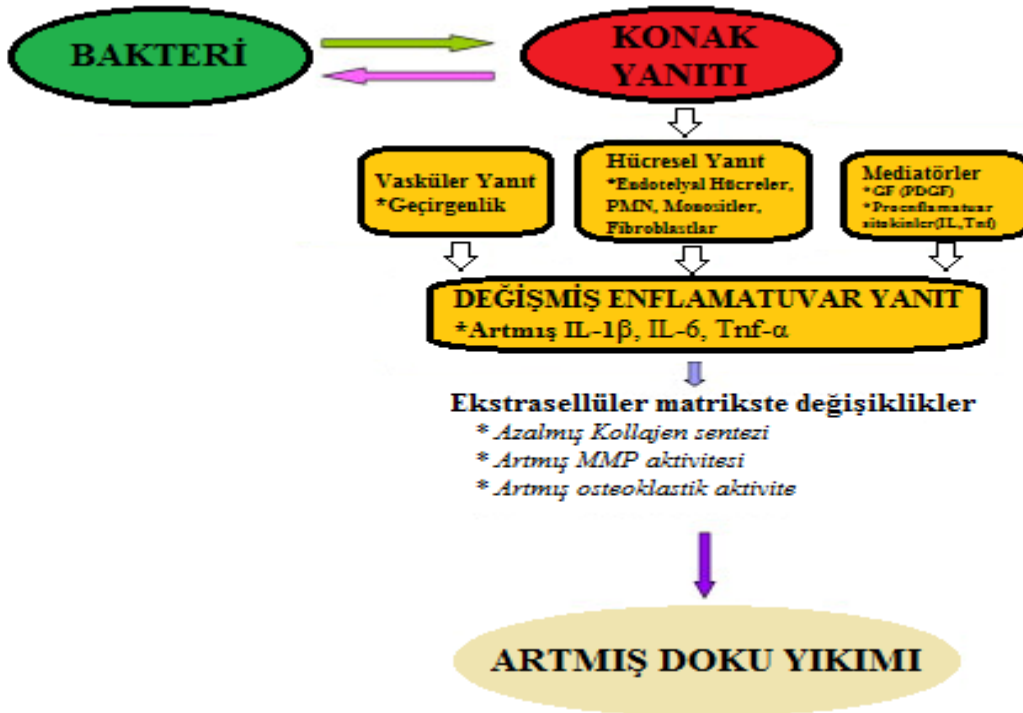
Çalışmamızın amacı, hümik asidin anti-bakteriyel ve anti-enflamatuvar özelliklerinden yararlanarak, ratlarda oluşturulan deneysel periodontitis modelinde kemik rezorbsiyonu ve gingival enflamasyon üzerinde hem sistemik hem de lokal etkisinin histopatolojik ve morfometrik açıdan araştırılmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Periodontal Hastalık

Periodontal hastalıklar diş-destek yapılarının yıkımı ile karakterize kronik, enfeksiyöz ve enflamatuvar hastalıklardır [42]. Hastalığın başlaması için periodontopatojenlerin varlığı gereklidir fakat bu tek başına yeterli değildir [43]. Periodontopatojenlere karşı oluşan sürekli bir konak enflamatuvar ve immün yanıt yumuşak ve mineralize periodontal dokuların yıkımına neden olur [43, 44]. (Şekil.1)

Gingivitis, mikrobiyal biyofilm ve konak arasındaki etkileşim sonucunda gelişen, dişetinde kızarıklık, şişlik ve kanama ile karakterize olan enflamatuvar bir hastalık olup dişetiyle lokalize, geri dönüşümü olabilen bir durumdur. Periodontitis ise bakteriyel etkiler sonucunda dişetinde başlayan iltihabi değişimlerin diş-destek dokularına yayılmasıyla alveoler kemikte yıkım, cep derinliğinde artış, klinik ataşman kaybı, mobilite ve tedavi edilmediği takdirde diş kaybı ile sonuçlanabilen geri dönüşümsüz kronik enflamatuvar bir hastalıktır [45, 46].



Şekil 1. Bakteri ve konak yanıtı arasındaki etkileşim sonrasında artmış doku yıkımının şematik gösterimi [47].

2.1.1. Biyofilm Tabakası

Dişler temizlendikten kısa bir süre sonra salya ve dişeti oluğu sıvısında bulunan protein ve glikoproteinlerden oluşan ince bir pelikül tabakası diş yüzeyini kaplar. Kısa bir süre içerisinde ilk gram pozitif bakteriler olmak üzere bu tabaka üzerine tutunur ve kolonize olurlar [48]. Ağız içerisinde dental yüzeyler ve mukoza üzerinde biyofilm tabakası oluşur fakat bu yüzeylerdeki biyofilm tabakası birbirinden farklı oral mikroflora kompozisyonu gösterirler [49]. Biyofilm tabakası konakta lokal ve sistemik immün ve enflamatuvar yanıtı başlatır [50, 51]. Periodontal hastalıkta, biyofilm oluşumuna verilen enflamatuvar yanıt dişeti oluğu sıvısı akışında (bazen kanama eşlik edebilir) ve sıcaklıkta lokal bir artış olarak görülür [52]. Bu proteolitik metabolizma şekli pH değerinde az da olsa bir artışa neden olur. PH değerindeki bu artış enflamasyon sırasında subgingival alandaki periodontopatojenlerin birbirleriyle olan rekabetini artırır [53]. Diş yüzeyinde konağa ait hücreler kolonize olduğunda, bakteriler de aynı bölgede mikrokoloniler oluşturur. Daha sonra bu mikrokoloniler yapışkan bir ekstrasellüler polimerik madde salgırlar [54]. Ekstrasellüler polimerik madde içerisinde polisakkaritler, proteinler, lipidler, nükleik asitler ve diğer polimerleri barındırır. Bu da bakterilerin hem yüzeye hem de birbirlerine tutunmasına yardım eder [55].

2.1.2. Mikrobiyal Dental Plak (MDP)

Periodontitisin oluşumunda rol oynayan primer etiyolojik etken MDP ve ürünleridir [4, 5]. MDP; diş yüzeyi üzerinde gelişen, tükürük ve bakteriyel orijinli bir polimer matriks içerisine gömülmüş olan mikrobiyal topluluk olarak tarif edilir [56]. Supragingival ve subgingival bölgelerdeki MDP'nin mikrobiyal içeriği farklılık gösterir. Başlangıçta sayıca fazla olan Gram pozitif mikroorganizma oranı, lezyon ilerledikçe Gram negatif anaeroblar lehinde değişir [57]. Subgingival plak örneğinde yaklaşık 300-400 farklı bakteri türü bulunur. Fakat yıkıcı periodontal hastalığın patogeneğinde yaklaşık 10-20 türün rol oynadığı düşünülür [58]. Turuncu kompleks olarak adlandırılan ve hastalıkla ilişkilendirilen ilk bakteri topluluğu *Prevotella intermedia* ve *Fusobacterium nucleatum* gibi patojenleri içermektedir. Hastalık daha da ilerlerse mikrobiyata 'kırmızı kompleks' adı

verilen bakteri topluluğuna kayar. Bu kompleks *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* ve *Treponema denticola* gibi periodontal patojenleri içerir [59, 60].

2.1.3. Periodontal Hastalığın Patogenezi

Subgingival plak mikroskop altında incelendiğinde MDP içerisinde mikroorganizmalar ve nötrofiller görülür [61]. Nötrofiller enfeksiyon oluşturan ajanlara karşı konak savunmasında ilk savunma hattını oluştururlar [62]. Nötrofillerin en önemli görevi fagositoz yapmak ve bakterileri yok etmektir [63]. Dişeti oluşunda ya da periodontal cepte mikrobiyal kolonizasyon gibi spesifik bir uyarın varlığında, nötrofiller periodontal dokulara dolaşım sistemi yardımıyla gelerek endotelial hat boyunca sıralanırlar. Endotelial hat boyunca gerçekleşen bu yuvarlanma hareketi nötrofiller yüzeyindeki selektinlerin endotelial hattaki lektinlere zayıf bir şekilde bağlanması yoluyla kolaylaşır [64].

MDP subgingival alana ulaştığında, nötrofiller bakterilerce salınan ve kemotaktik peptidler adı verilen moleküllere saldırmak için dişeti oluşuna ya da periodontal cep içerisine toplanırlar. Ayrıca bakteriler ve ürünlerinin epitel hücrelerine zarar vermesi durumunda epitel hücrelerince sitokin adı verilen moleküllerin salınmasına neden olurlar. Sulkus içerisindeki nötrofiller bakteri ve ürünlerini fagosite ederler. Eğer nötrofiller fagositoz esnasında bakteriler ile aşırı şekilde dolarsa degranüle olarak ve toksik enzimlerini ortama salırlar [61]. Nötrofiller etkilerini iki yolla gösterir [64]:

1. Myeloperoksidaz (MPO) gibi enzimler ile lizozomal granüllerinden birçok proteolitik enzim salgırlar.
2. Süperoksit ve hidroksil radikalleri sentezleyip salgılayarak bu iki ürünü hidrojen peroksite dönüştürüp oksidatif patlama yaparlar.

Periodontal hastalıklar konak yanıtı sonucunda bağ dokuda bir takım değişikliklerin görüldüğü, dişeti ve dişleri destekleyen dokuları etkileyen lokal iltihabi hastalıklardır [4, 65]. Periodontal hastalıkların başlama süreci multifaktöriyeldir. Hastalığın başlama sürecinde periodontopatojenler ve diğer anaeroblar enflamasyonu başlatır ve dokuları

hasara uğrattırır. Doku hasarına hem bakteri ve ürünleri hem de konak kaynaklı etkenler neden olur [66]. Bu etkenlerden bazıları endotoksinler [67], bakteriyel hyaluronidazlar [68], konak kollajenazları [69], katepsinler [70], nötral proteazlar (elastaz, tripsin, kimotripsin) [71], alkalın fosfataz [72], β -glukuronidaz ve arilsülfataz [73, 74] ve özellikle IL-1 α ve IL-1 β olmak üzere sitokinlerdir [75].

Birçok mikrobiyal yüzey protein molekülü konakta immün yanıtı başlatabilir ve lokal doku enflamasyonu oluşturabilir [66]. Proteazlar kollajen yapısında yıkıma neden olurlar ve bu yıkımdan meydana gelen boşluklara lökosit infiltrasyonu görülür [29]. Periodontal dokular dişe daha gevşek tutunur ve dokular ödemli ve daha enflamasyonlu bir hale gelir. Periodontitiste dişe tutunan bağ doku atışmanı hasara uğrar. Böylece epitelyal hücreler kök yüzeyi boyunca apikale migre olur ve cep daha da derin bir hal alır. Cep derinleştikçe doku enflamatuvar infiltratları daha derin dokulara ulaşır. Alveol kemiğe ulaşan bu infiltratlar nedeniyle osteositler kemik yıkımını başlatırlar [76]. Cep derinliği arttıkça mikroflora daha anaerobik hale gelir ve konak yanıtı daha yıkıcı ve kronik olur [61].

2.1.4. Deneysel Periodontitis Modelleri

Yıkıma uğramış periodontal dokularda uygulanan yeni rejeneratif tedavileri test etmek ve onaylamak için uygun deneysel hayvan modelleri gereklidir. Hayvan çalışmaları insanların genellikle kabul etmediği histolojik biyopsi gerektiren yeni klinik tedaviler için yararlı uygulamalardır [77]. Periodontal hastalıklar insanlarda retrospektif çalışmalar için uygun olsa da, devam eden doku yıkımını gösteren klinik parametrelerin belirlenmesini içeren çalışmalar insanlarda her zaman mümkün değildir [78]. Bu nedenle insanlardaki periodonsiyuma benzer bir anatomiye sahip olan ve insanlardaki periodontal hastalığı taklit edebilen hayvanlarla yapılan deneysel hayvan modeli çalışmaları önerilmektedir. Bu özelliğe sahip deney hayvanlarının kullanımı çalışma sonuçlarının insanlara uyarlanabilmesi açısından önemlidir. Periodontal dokuların enflamatuvar yıkımı fareler, ratlar, tavşanlar ve maymunlar gibi birçok deney hayvanında türe göre spontan olarak gelişebilir veya deneysel olarak oluşturulabilir [79, 80].

Kemirgenler ve ratlar deneysel periodontal araştırmalar için uygun modellerdir [81]. Fakat periodontal hastalığın görölme sıklığı ratlarda insanlara göre daha azdır. Patolojiyi oluşturmak için patojen bakterilerin periodonsiyuma inoküle edilmesi, karbonhidrattan zengin diyetlerin verilmesi veya dişlerin etrafına ligatür yerleştirilmesi gerekmektedir. Bu modeller sıklıkla mikrobiyolojik ve immünolojik çalışmalarda tercih edilmektedir [82].

Ratlar periodontal hastalığın patogenezinde en yaygın çalışılan kemirgenlerdir. Çünkü diş yüzeyine tutunan birleşim epiteli ve sığ gingival sulkus gibi özellikleri ile ratların periodontal alanları insanlardaki periodonsiyum ile benzerlik göstermektedir [81]. Ayrıca kolay ve ucuz elde edilebilir olmaları, küçük olmaları, fazla sayıda denekle çalışma şansı, bakımlarının kolay olması ve yaşama karşı dayanıklı olmaları gibi avantajlarından ötürü çalışmalarda tercih edilirler [83]. Ratlardaki birleşim epiteli insanlardaki gibi yabancı cisimler, bakteriyel endotoksinler ve enflamatuvar hücre eksüdasyonları için bir giriş yolu olarak görölür [80]. Normal şartlar altında ratlar periodontal hastalıklara oldukça dirençlidirler. Fakat diş etrafına ligatür yerleştirilmesiyle deneysel periodontitis modeli oluşturulabilir. Deneysel periodontitis modelinde ilk adım ödem ve ülserasyonun göröldüğu marjinal gingivitis iken, ikinci aşama ise yiyecek debrisleriyle dolu derin cep formasyonudur. şiddetli periodontitis durumlarında lezyon interradiküler alanları etkiler ve şiddetli alveol kemik rezorbsiyonu sonucunda kök yüzeyleri açığa çıkar [84].

Kemirgenlerde dentisyondaki fizyolojik değişiklikler yaşam boyunca devam eder. Ratlar her bir yarı çenede bir tane kökü bulunmayan kesici diş ve üç tane molar diş sahiptir [85]. Kesici dişlerin köksüz olması ve sürekli erüpsiyona uğraması periodontal hastalıklarda model olarak kullanımını kısıtlar. Molar dişlerin periodontal dokularının yapısı ve organizasyonu (dişeti epiteli, sulkuler epitel, birleşim epiteli, periodontal kollajen fibrilleri, hücreli-hücretsiz sement ve alveoler kemik) insanlar ve ratlarda oldukça benzerdir [84, 86]. Bütün molar dişler ratlar 5 haftalık iken tamamen sürmüş olurlar [78]. Dişlerin sürekli erüpsiyonuna ve kemik ile sementin apozisyonuna bağlı olarak oklüzal yüzeylerde hızlı bir değişiklik söz konusudur. Bu da diş pozisyonlarında aşırı bir değişikliğe neden olur. Özellikle molar dişlerde oklüzal-distal-bukkal yönde sürekli bir hareket meydana gelir. Ayrıca yaşla birlikte interproksimal atrizyon devam ederse interdental alan daralmaya başlar [87].

Ratlardaki bağ doku ve epitelin birçok histolojik özelliği insanlarla benzerlik gösterir. Fakat insanlarda keratinize olmayan sulkuler epitel ratlarda keratinizedir [86]. Ratlarda dişeti sulkusuna yerleştirilen maddelerin birleşim epitelinden geçtiğini gösteren çalışmalar mevcuttur [88, 89]. Periodontopatojenlerin varlığından birkaç gün sonra klinik olarak hafif sondlamayla dişetinde kanama görülebilir [90]. İnsanların oral kavitelerinden izole edilen bazı gram pozitif bakteri türleri ile ratlar enfekte edildiğinde 84. gün sonunda periodontal yıkım gözlenmiştir. Bu türler *Actinomyces viscosus*, *Actinomyces israelii*, *Streptococcus mutans* [91], *Actinomyces naeshundii* [92] dir. Kemik yıkımı oluşmaya başladığında ratlarda sürekli bir yıkım söz konusuysen insanlarda dönemsel bir yıkım söz konusudur. Gram negatif bakterilerin indüklediği lezyonlardaki enflamasyon minimaldir. Bağ doku infiltratı primer olarak nötrofilleri ve daha az sayıda lenfositleri içerir. Plazma hücreleri ise bulunmamaktadır. Bu nedenle ratların gram negatif bakterilere yanıtındaki yıkım süreci hücre-aracılı immün yanıtın oluşmaması şeklinde gerçekleşir. Bu özelliği ile insanlardan farklılık gösterir [93]. Yine insanlarda lezyon kök yüzeyi boyunca uzanırken ratlarda lezyonun en apikal uzantısı interdental dokuların orta kısmında lokalize olur. Yani birleşim epitelinin apikale migrasyonu kemik kaybını takip etmez [94]. Enflamasyona verilen dişeti yanıtı insanlardaki gibi kronik değil akutur [79].

2.1.5. Sitokinler

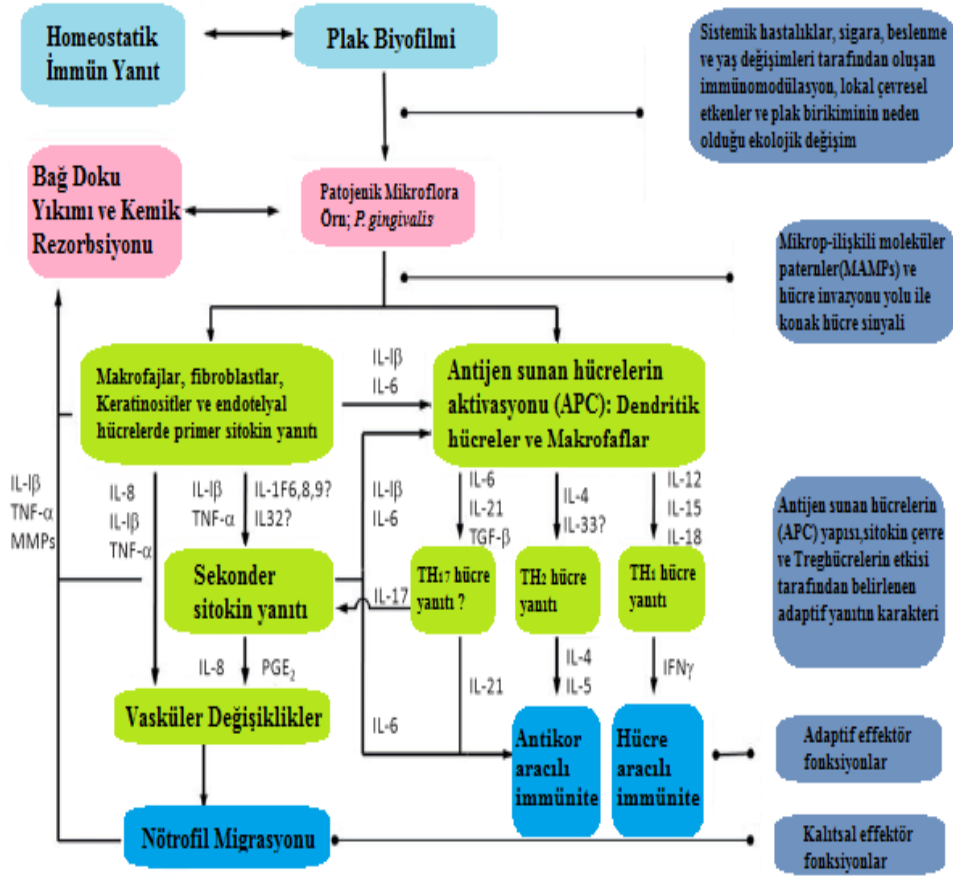
Periodontal hastalığın patogenezini oluşturan olaylar enflamasyonla ilişkili moleküller tarafından başlatılır ve düzenlenir. Bu moleküller bölgedeki gingival hücrelerden, gingival dokuya infiltre olan lökositlerden, plazmada bulunan kompleman sistem ve kinin sistemi tarafından sentezlenirler [95]. Sitokinler, molekül ağırlığı 8-40.000 Da arasında değişen, hedef hücrelerin aktivitelerini değiştiren veya düzenleyen, protein ve/veya glikoprotein yapılı immünomodülatörlerdir [96, 97]. Temel görevleri immün yanıtın regülasyonudur [98]. Sitokinler IL, IFN ve TNF ailesini içerir [99]. Sitokinler; lenfositlerden salındığı zaman lenfokin, monosit ve makrofajlardan salındığı zamanda monokin adını alır. Kemotaksiste etkili olanlarına kemokin, tek bir lökosit tarafından üretilen ve diğer lökositler üzerinde etkili olanlara ise interlökin denir [97]. Lenfokin,

monokin, interlökin ve interferon olarak da adlandırılan sitokinlerin ortak karakteristik özellikleri [100];

1. Sitokinler doğal ve spesifik immünitinin başladığı fazda üretilirler.
2. Bir sitokin farklı hücreler tarafından yapılabilir.
3. Bir sitokin farklı hücreler üzerine etki gösterebilir.
4. Düşük moleküler ağırlıktadırlar.
5. Bir sitokinin aynı hedef hücre üzerinde farklı etkileri olabilir. Bu etkilerin bazıları aynı anda, bazıları ise dakikalar, saatler hatta günler sonra oluşabilir.
6. Birçok sitokin aynı etkiyi gösterebilir.
7. İki sitokin birbirlerinin etkisini ortadan kaldırabilir (antagonizm), arttırabilir (sinerji) veya değişik bir etkiye yol açabilir.
8. Sitokin sentez ve sekresyonu kısa süreli olaylardır. Sentezleri genellikle yeni gen transkripsiyonu ile başlar, hücrede önceden yapılmış halde bekletilmezler.
9. Sitokinler hedef hücre yüzeyindeki spesifik reseptörlere bağlanarak etkilerini başlatırlar.
10. Belli bir biyolojik etkiyi sağlamak için gereken sitokin miktarı genellikle çok düşüktür.
11. İmmünite ve enflamasyon reaksiyonlarında konak cevabının genişliği ve süresini düzenlerler.
12. Her zaman geçici bir süreyle ve lokal olarak sentezlenirler.
13. Son derece güçlü etkiye sahiptirler.

Hücresel bağışıklıkta etkili olan IL-2, TNF- β ve IFN- α gibi sitokinler Th1 hücrelerinden salgılanırken, humoral bağışıklıkta rol oynayan IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 ise Th2 hücrelerinden üretilir [101]. Endotel hücreleri ve fibroblastlardan köken alan sitokinlerin bir kısmı enflamasyonun ilerlemesine sebep oldukları için “pro-enflamatuvar sitokin” ler, bazıları da enflamasyonu baskılayıcı özellikleri nedeniyle “anti-enflamatuvar sitokin” ler olarak tanımlanır. İnterlökin-1 β , IL-6, TNF- α pro-enflamatuvar etki gösterirken, B-lenfositlerin esas uyarıcıları olan IL-4, IL-10 ve IL-13 gibi sitokinler anti-enflamatuvar özelliği ile IL-1, TNF ve kemokinler gibi pro-enflamatuvar sitokinleri kodlayan genleri baskılama yeteneğine sahiptirler [97, 102].

Periodontal hastalığın patogeneğinde sitokinlerin rolü yaygınca araştırılmıştır. Kemik yıkım belirleyicilerinden biri olarak varsayılan sitokinler, kemik çevresinde bulunur ve osteoklast oluşumu üzerinde etkilidir [103]. Çalışmalar periodontopatojenik bakterilere ve ürünlerine yanıt olarak birçok pro-enflamatuvar sitokinin salındığını göstermiştir. Bu sitokinler periodonsiyumda enflamatuvar yanıtı başlatır ve sürdürürler [13, 104]. Periodontal hastalıkta immün yanıtın başlaması, organizasyonu ve sürdürülmesinde önemli bir rol oynarlar. Bu nedenle diagnostik ve terapötik olarak oldukça önemlidir [99]. Enflamatuvar hastalıklara karşı konak savunmasında etkin olan sitokinler aşırı üretildiklerinde dokularda zararlı etkilere neden olabilir [97, 102]. Periodontal hastalıkta immün yanıt üzerinde sitokinlerin oynadığı kilit rol Şekil.2’de gösterilmiştir.



Şekil 2. Sitokinlerin immün yanıtındaki etkilerinin şematik gösterimi [99].

2.1.5.1. IL-1 β

IL-1 sitokinleri tek bir peptid olarak üretilirlerken, çoğu interlökinler iki farklı peptid zinciri içeren homodimer ya da heterodimer olarak üretilir [99]. IL-1 enfeksiyon bölgesine hücrelerin toplanmasını sağlayan pro-enflamatuvar bir sitokindir. Kemik rezorpsiyonunu iletir, monositler ve fibroblastlardan prostaglandin salınımını artırır. Ayrıca ekstrasellüler matriks (ECM) proteinlerini yıkan metalloproteinazları salıverir [16]. IL-1'in periodontal dokularda yaygın olarak bulunan formu IL-1 β 'dir ve temel olarak makrofajlardan salınırlar [17, 105]. Enflamatuvar ve immün yanıtın temel düzenleyicisi olan güçlü bir multifonksiyonel sitokindir. Biyolojik aktivitelerini pikomolar (10⁻¹² M) ve femtomolar (10⁻¹⁵ M) konsantrasyonlarında gösterir [106]. Periodontitis hastalarının enflamasyonlu periodontal dokularında artmış IL-1 düzeyi olduğu rapor edilmiştir [18,

107]. IL-1 β kemik rezorbsiyonunu stimüle etmede IL-1 α 'dan 15 kat, TNF- α 'dan 500 kat daha etkilidir [108].

IL-1 β yapısal olarak IL-1 α ile ilişkili olan 17 KDa'luk bir glikoproteindir [109]. Başlıca monositler ve makrofajlar [17, 105, 110] olmak üzere fibroblastlar ve kemik hücreleri tarafından üretilir [110]. IL-1 sitokin ailesinin bir prototipidir. İmmün-ilişkili hastalıklarda ve immün yanıtta temel bir rol oynadığını gösteren çalışmalar mevcuttur [102, 111]. IL-1 β , sentezi için gerekli enzimleri aktive ederek nitroz oksit, platelet aktive edici faktör ve PGE₂ sentezini stimüle eder. Bu mediatörler enflamasyonla ilişkili vasküler değişiklikler için gereklidir ve enfeksiyon ve/veya hasar bölgesine kan akışını kolaylaştırırlar. Ayrıca membran adezyon moleküllerinin salınımını artırır. Diğer hücrelerden CXCL8 (IL-8) salınımını stimüle eder. Bu ve benzer kemokinler etkilenmiş dokulara nötrofil infiltrasyonunu stimüle eder. Makrofajlardan B-hücreleri aktive eden IL-6 salınımını tetikler [99]. IL-1 β T-hücrelerinin antijen-aracılı stimülasyonunu artırır [112]. İmmüno-histolojik çalışmalar ile dişeti dokularının lamina propriasında IL-1 β varlığı gösterilmiştir [113, 114]. IL-1 β düzeyi plağın indüklediği gingival enflamasyonda [115] ve aktif periodontitis alanlarında [116] artar. IL-1 β 'nın dokudaki seviyesi hastalık şiddetinin klinik ölçümleriyle de ilişkilidir [113, 114]. Yine yapılan bir hayvan çalışmasında enflamasyon ve kemik rezorbsiyonunda IL-1 β seviyesinin önemli derecede arttığı gösterilmiştir [117].

IL-1 β 'in biyolojik bazı özellikleri; T-lenfositlerin stimülasyonu ve lenfokin üretimi [118], B-lenfositlerin proliferasyonu ve antikor üretimi [119], fibroblast proliferasyonu, monositler ve fibroblastlar tarafından salınan PGE₂'lerin stimülasyonu ve metalloproteinazların salınımıdır [16]. Ayrıca osteoklast formasyonunda ve kemik rezorbsiyonunda [120], nötrofil kemotaksis ve aktivasyonunda da [121, 122] rol oynar. Periodontitis hastalarının dişeti oluşu sıvılarında ve periodontal dokularında artmış IL-1 β düzeyi saptanmıştır [18, 75, 107, 123].

2.1.5.2. IL-10

IL-10 insan immün yanıtında var olan en önemli anti-enflamatuvar sitokindir. Birinci kromozom üzerindeki bir gen tarafından kodlanır. IL-10 birçok sistemik ve enflamatuvar hastalıkta dolaşımında ölçülebilir [124].

IL-10 süper ailesi daha sonraları keşfedilen bir takım sitokinleri içerir. Bu sitokinler IL-19, IL-20, IL-22, IL-26, IL-28 ve IL-29'dur. Fakat bu sitokinler periodontal hastalıklarda henüz çalışılmamıştır [99].

IL-10 immünoşüpresif özelliklerinden dolayı pleiotropik sitokin olarak bilinir [125-127]. Başlıca; T-hücre, B-hücre ve monositler/makrofajlar tarafından üretilirler [126-128]. Hayvan çalışmalarından elde edilen sonuçlarda yıkıcı enflamatuvar cevabın azaltılarak düzenlenmesinde IL-10'un merkezi rolü gösterilmiştir [129]. IL-10'un dişeti oluşu sıvısında ve periodontal dokularda varlığını gösteren birçok çalışma bulunmasına rağmen çalışmalardaki örneklerin sonuçları farklılık göstermektedir [130-132]. IL-10 doku yıkımının azaltılması ile ilişkilendirilir. IL-1, IL-6, IL-8 ve TNF gibi pro-enflamatuvar sitokinlerin üretimini inhibe eder [133, 134]. Bu özelliğinden dolayı akut enflamatuvar yanıt sürecini azaltmada önemli bir düzenleyici olarak rol oynar [133]. Ayrıca makrofajlarda metalloproteinaz doku inhibitörü (TIMP) sentezini arttırarak metalloproteinaz üretimini durdurur [135].

Periodontal hastalıkta rol oynayan, kemik ve bağ dokusunun homeostazisini bozan faktörleri belirlemek önemlidir. IL-1, TNF- α ve Th1-tip sitokin IFN- γ gibi enflamatuvar mediatörler osteoklastogenezin ve MMP üretiminin pozitif düzenleyicisi olarak bildirilir. Bu etkinin tersi etkiyi IL-4 ve IL-10 gibi Th2-tip sitokinler gösterir [136, 137]. Periodontal lezyonlarda Th1 ve Th2-tip mediatörlerin üretimi arasındaki dengesizlik hastalığın belirleyicilerinden olan MMP/TIMP ve Nükleer faktör kappa- β 'nın reseptör aktivatörü ligandı (RANKL) / Osteoprotegrin (OPG) arasındaki dengeyi bozar [138, 139]. MMP, RANKL ve katepsin-K ile IL-1 β , TNF- α ve IFN- γ arasında pozitif bir ilişki vardır. Birçok enflamatuvar ve Th1-tip sitokinler periodontal hastalıkların patogenezinde zararlı bir rol oynar. Özellikle IL-1 ve TNF- α MMP üretiminin stimülasyonu ve kemik rezorpsiyonuyla ilişkilidir [136, 140]. Th2 sitokinleri olan IL-4 ve IL-10 düzeyleri TIMP ve OPG'in artmış

üretimiyle ilişkili bulunmuştur. Bununla ilgili olarak Th2 sitokinleri (IL-4 ve IL-10) hastalıklı periodontal dokularda ve hastalık şiddetinin azalmasıyla üretimi artar [141, 142]. Garlet ve ark. [143] yaptıkları bir çalışmada sitokinlerin MMP/TIMP ve RANKL/OPG arasındaki dengeyi düzenlediğini göstermiştir. Deneysel periodontal hastalığın erken dönemleri boyunca periodontal dokudaki TNF- α , IL-1 β ve IFN- γ düzeylerinin yüksek olduğunu ve ayrıca MMP, RANKL ve katepsin-K üretimi ile TNF- α , IL-1 β ve IFN- γ sitokinleri arasında pozitif bir ilişkinin olduğunu bildirmiştir. Bu durum, enflamatuvar ve Th1-tip sitokinlerin periodontal hastalık patogeneğinde zararlı bir rol oynadığını gösterir. IL-4 ve IL-10 düzeylerinin enfeksiyondan 30 gün sonra TIMP ve OPG salınımına paralel olarak önemli oranda arttığı gösterilmiştir.

Passoja ve ark. [144] yaptıkları bir çalışmada periodontitis hastalarında serum IL-10 düzeyinin sağlıklı kontrollere göre daha düşük olduğunu göstermişlerdir.

2.2. Konak Modülasyonu

Periodontal patojenler kemikte osteoklastik rezorpsiyonu aktive edebilen ve dişetin ECM'ini yıkıma uğratabilen hücre duvar komponentlerine ve enzimlere sahiptir. Fakat ileri bilgiler periodontitiste ECM ve kemik yıkımının büyük kısmına konak kaynaklı enzimlerin, sitokinlerin ve diğer mediatörlerin aracılık ettiğini göstermektedir. Bakteriler konak mekanizmalarını aktive ederek hastalığı başlatırlar ve periodonsiyumu yıkıma uğratırlar. Konak yanıtı doku yıkımında önemli bir rol oynadığı için çalışmalar bazı yıkıcı konak mekanizmalarını değiştirerek periodontal yıkımı önleme üzerine yoğunlaşmıştır. Bakteriyel eklentinin uzaklaştırılması ve düzenli dıştaşı temizliği periodontitis tedavisinde izlenebilecek en doğru tedavi seçeneğidir. Fakat bazı hastalarda bakteriyel eklentilerin rutin uzaklaştırılması periodontal hastalığın önlenmesinde yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle bakteri kontrolüne ek olarak spesifik konak mediatörlerinin kontrolünü içeren destekleyici tedaviler yararlı olabilir [145].

Geçen 20 yıl boyunca çeşitli farmakolojik ajanların periodontal hastalığın yönetiminde konak modülatörü olarak olası rolleri araştırılmıştır. Bunlar NSAI ilaçlar, bisfosfonatlar ve tetrasiklinlerdir. Ayrıca periodontal tedavide denenen yeni ilaçlar anti-

sitokin ilaçlar, çözünebilir sitokin blokerleri ve lipoksindir. Günümüzde periodontal hastalığın tedavisinde konak yanıt modülatörü olarak geçerli sayılan tek sistemik ilaç subantimikrobiyal doksisisiklidir [146].

Periodontitisin tedavisinde kullanılan antiproteinazlar tetrasiklinlerdir. Antimikrobiyal etkilerinin yanında tetrasiklinler periodontal dokuların yıkımıyla ilişkili olan MMP'ları, osteoklastları ve nötrofilleri inhibe edebilme kabiliyetine sahiptir [147]. Ayrıca tetrasiklinlerin anti-enflamatuvar özellikleri vardır ve osteoklastların inhibisyonuyla kemik koruyucu ajan olarak da kullanılabilirler [148]. Kullanılan tetrasiklinler arasında doksisisiklin en çok çalışılan ve en güçlü kollajenaz inhibitörüdür [149].

Geçmiş 10 yıl boyunca bisfosfonatların kemik koruyucu ajan olarak kullanımı osteoporöz ve diğer kemik-rezorptif hastalıkların tedavisinde uygulanmaktadır. Bisfosfonatlar kemikler tarafından emilir ve osteoklastik aktiviteyle ilişkili asidifikasyon sürecinde lokal olarak salınırlar. Bisfosfonatlar osteoklastik aktiviteyi inhibe ederek kemik yıkımını durdururlar. Bu nedenle periodontitis hastalarında alveoler kemik kaybının durdurulmasında potansiyel bir rol oynayabilirler [150]. Bisfosfonat ailesinin bir üyesi olan alendronatın köpeklerde oluşturulan ilerleyen periodontitis modelinde ve maymunlarda ligatürle oluşturulan deneysel periodontitis modelinde alveoler kemik kaybını önemli oranda azalttığı gösterilmiştir [25, 31].

Subgingival plak tarafından oluşturulan mikrobiyal atak, periodontal dokularda konak immün-enflamatuvar yanıtın artmasına neden olur. Bu yanıt enflamatuvar sitokinlerin (IL'ler, TNF- α), prostanooidlerin (PGE₂) ve enzimlerin (MMP) aşırı biçimde üretilmesiyle karakterizedir. Bu pro-enflamatuvar mediatörler periodontal yıkımın temel bileşenleri olup hastalığın klinik belirti ve semptomlarına neden olurlar [146]. Enflamatuvar mediatörlerin periodontal dokulardaki düzeylerine göre pro-enflamatuvar ve anti-enflamatuvar sitokinler ile enzimler arasındaki göreceli denge daha önemlidir. Bu nedenle, prostaglandinler ve çoğu sitokinler gibi pro-enflamatuvar mediatörler anti-enflamatuvar sitokinler ve lipoksinlerle dengelenir [151]. MMP'nin yıkıcı aktivitesi inhibitörü olan TIMP ile dengelenir. Periodontal dokulardaki pro-enflamatuvar ve anti-enflamatuvar aktiviteler arasındaki dengesizlik periodontal yıkımın temel bir belirleyicisidir. Bu nedenle uygulanacak konak modülatör tedavinin amacı pro-enflamatuvar mediatörler ve yıkıcı

enzimler ile anti-enflamatuvar mediatörler ve enzim inhibitörleri arasındaki dengeyi sağlamaktır [146].

Birçok çalışma periodontitisin patogeneğinde araşidonik asit metabolitlerinin, özellikle de prostaglandinlerin, önemli rollerini göstermiştir [11, 152]. Periodontitisin tedavisinde çeşitli NSAİ ilaçlar klinik başarı sağlamıştır. NSAİ ilaçlar etkilerini kemik kaybı miktarını azaltarak göstermektedir [145].

2.3. Hümik Asit

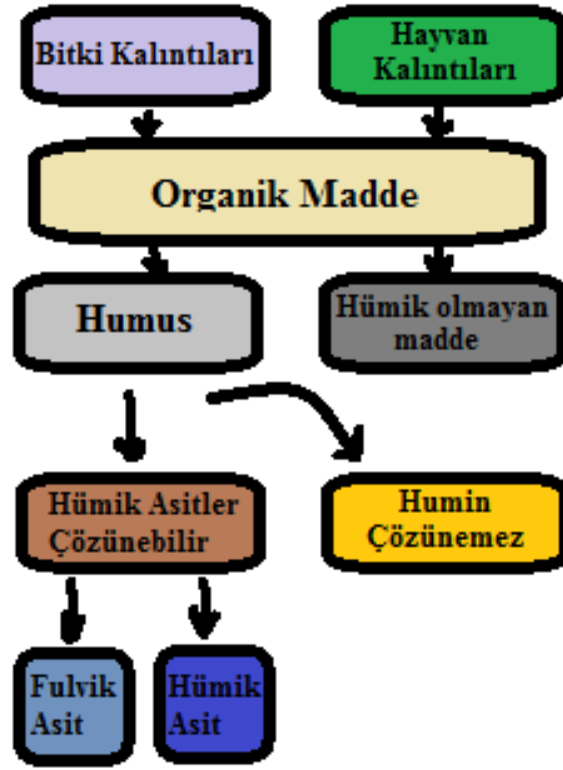
Hümik maddeler üçe ayrılır: Fulvik asitler, hümik asitler ve humin. (Şekil.3) Hümik asitler hümik maddelerinin en önemli parçalarından birisidir. Hümik asitler doğada birçok farklı kaynaktan meydana gelmektedir ve doğadaki en geniş karbon rezervlerinden birini oluşturmaktadır [36]. Bu kaynaklar başlıca linyit, turba, mumie, shilajit, gyttja, canlı bitkiler, yosun vs. olarak sayılabilir [153]. Bütün topraklarda, okyanus ve deniz gibi suların yüzeylerinde ve altında, sulak topraklarda bol miktarda bulunurlar ve humusun kahverengisiyah renkli, polimerik, alkali-çözünebilir organik asit fraksiyonlarıdır [154]. (Şekil.6)

Hümik asidin kimyasal karakteristikleri ve fiziksel özellikleri elde edildikleri kaynaklara bağlı olarak değişiklik gösterir [155, 156]. Turba (peat) gibi doğal humifikasyon ürünleri medikal alandaki çeşitli uygulamalarda farmakolojik ajan olarak geliştirilmektedir [157]. Bu ajanlar anti-enflamatuvar ajan olarak başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Çünkü lokal olarak analjezik ve anti-enflamatuvar özellikleri gösterilmiştir [158, 159].

Farklı kaynaklardan elde edilen hümik asitler yakıt, organik gübre, tıbbi malzemeler için hammadde ve bazı endüstriyel ürünlerin sentezlenmesinde başlama materyali olarak kullanım alanı bulmaktadır. Bu kaynaklardan bir tanesi de turbadır. Turbanın çamur terapisi (balneoterapi) olarak kullanımı uzun zamandır bilinmektedir [36]. Hümik asit yönünden zengin olan çürümüş orman turbası, Babil’de ve Roma İmparatorluğu’nda çok uzun zaman önce çamurun tedavi edici özelliğini bilen yerliler tarafından tedavi amaçlı kullanılmıştır. Sağlık kliniklerinin özel bir uygulaması olarak çamur banyoları 19. yüzyılın başlarında Avrupa’da önerilmiştir. Çamur tedavisi için önerilen endikasyonlar jinekolojik ve

romatizmal hastalıklar olmuştur. Daha sonraları turba içeren çamur banyoları özellikle mide, bağırsak veya karaciğer hastalıklarında uygulanmaya başlanmıştır [36].

Yapılan bir çalışmada osteoartrit üzerine çamur banyosu terapisinin olumlu etkisi gösterilmiştir [160]. Osteoartrit hastalarında yapılan bir diğer çalışmada ise sodyum humatın analjezik, anti-enflamatuvar ve lipid düzenleyici etkileri gösterilmiştir [161].

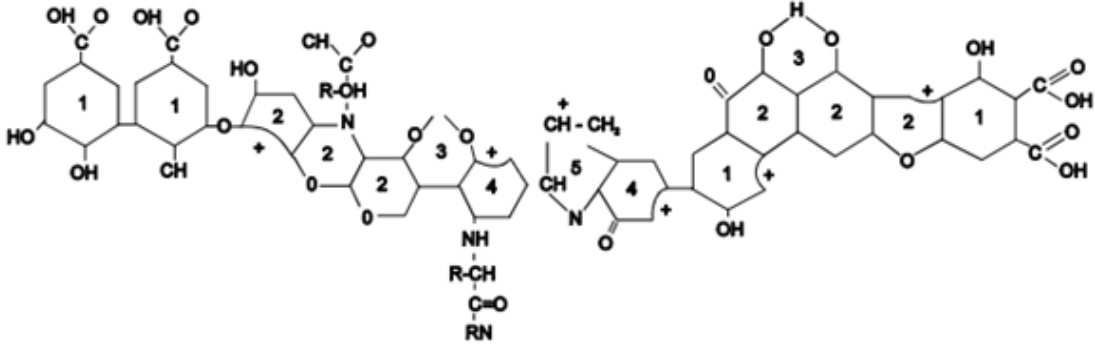


Şekil 3. Hümk maddelerin basit oluşum şeması.

2.3.1. Yapısı

Polifenoller, hümk asitlerin oluşumunda temel maddeler olarak kabul edilir ve hümk asit öncülleri olarak düşünülebilir. Hümk asitlerin yapısına bakılacak olursa; aminoasitler, ligninler, pektinler veya karbonhidratlar gibi çeşitli bileşenlerin moleküller arası etkileşimler sonucu bir araya geldiği görülür. Bu bileşikler birkaç şekilde oluşturulabilir ve ligninin bu süreçlerin çoğunda büyük bir rolü vardır [162, 163]. Fulvik ve hümk asitlerin

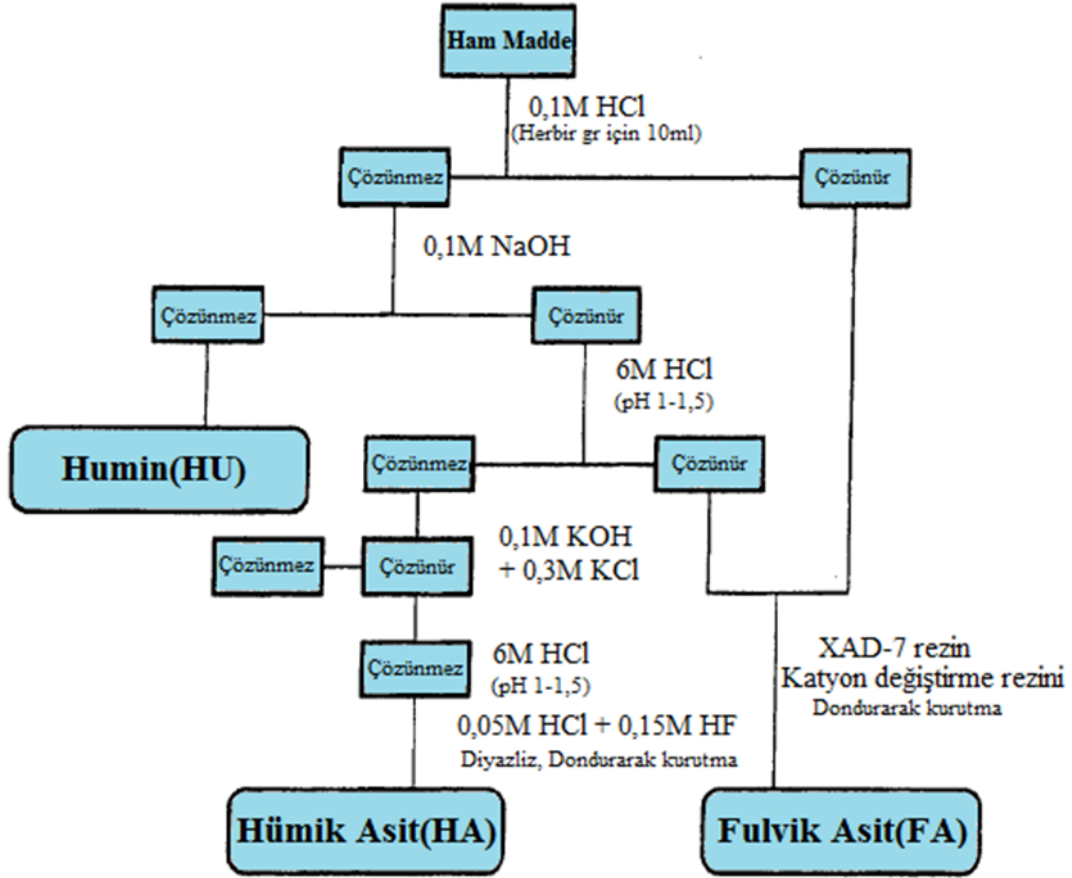
yapısını oluşturan başlıca elementler karbon, hidrojen, oksijen, azot ve kükürt (C, H, O, N ve S) tür. (Şekil.4) Bu elementler hümik maddelerin kökeni, ülkesi veya kıtası ne olursa olsun daima mevcuttur [164].



Şekil 4. Oksidize hümik asidin kimyasal yapısı [38].

Turba kaynaklı hümik maddeler, lignin benzeri maddelerin fenolik, karboksilik ve metoksil karbonlarını önemli oranda içerir. Hümik ve fulvik asitin bitkisel olarak başlangıç maddesi lignin ve vanilinin bozunma ürünleri olan vanilik asit, resorkinol, ferulik asit, protokateşik asit ve benzoik asit gibi farklı fenolik asitlerdir. Hümik maddeler bu bileşiklerin heterojen karışımını içerir. Bu nedenle tek bir yapısal formül ile tanımlama yapmak yeterli değildir. Fakat hümik maddeler aminoasitli, amino şekerli, peptidli ve aromatik gruplarla bağ kurmuş alifatik bileşikli kompleks aromatik makromoleküller olarak düşünülmektedir [153].

Orta moleküler hacme sahip olup moleküler ağırlığı 5.000-10.000 Da civarındadır. Bu madde içerisinde %33-36 oranında oksijen bulunurken nitrojen oranı yaklaşık %4 civarındadır [38].



Şekil 5. Uluslararası Hümik Maddeleri Derneği (IHSS) tarafından tarif edilen ekstraksiyon metodu.

HÜMİK MADDELER

FULVİK ASİT		HÜMİK ASİT		HUMİN
Açık Sarı	Sarı-Kahverengi	Koyu Kahverengi	Gri-Siyah	Siyah

Şekil 6. Hümik maddelerin doğada buldukları renkleri.

2.3.2. Sağlık Alanında Uygulamaları

Hümik asitlerin tıpta kullanım alanı bulduğu bazı endikasyonlar: yanıklar, yaralanmalar, kemik fraktürleri, dislokasyonlar, cilt hastalıkları, nöralji, artrit, zehirlenmeler, diyabet, kolesterolemi, egzama, amnezi, epilepsi, astım, dismenore ve ülser gibi sindirim bozukluklarıdır [37]. Hümik asitlerin etil alkolün neden olduğu gastritin zararlı etkilerini önemli şekilde azalttığı gösterilmiştir [165]. Hümik asitlere gittikçe artan ilginin ana sebebi antiviral, profibrinolitik, anti-enflamatuvar ve östrojenik özellikleri ile açıklanabilir [166]. Ayrıca hümik maddeler anti-bakteriyel [167, 168], anti-viral [169-173], antikanser [37], diüretik [37] ve immün stimüle edici ajan [37] gibi özellikleri sayesinde tıbbi uygulamalarda yeni kullanım alanları bulmaktadır. Yapılan bazı tıbbi çalışmalarda hümik maddelerin özellikle de fulvik asitlerin kanser ve kansere neden olan virüslere karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir [174-176]. Hümik asidin çalışılan tıbbi uygulamaları:

2.3.2.1. Kemik Metabolizması Üzerine Etkileri

Yapılan bir deneysel kemik fraktürü çalışmasında fraktür sonrası ilk hafta boyunca hümik asit uygulaması ile osteoid formasyonunda ve mineralizasyonda hızlanma tespit edilirken, hümik asit tedavisi ikinci haftaya ertelendiğinde osteoid formasyonu ve mineralizasyonun önemli oranda azaldığı gözlenmiştir [177]. Çocuklardaki kemik fraktürleri üzerine yapılan bir diğer çalışmada hümik asidin kemik rejenerasyonu üzerine pozitif etki sağladığı gösterilmiştir [178].

2.3.2.2. Antiviral Aktivitesi

Koksaki A9 virüs, influenza A virüs ve herpes simpleks tip-1 virüs (HSV-1) ile yapılan in-vitro ön çalışmalar, hümik asidin hem çıplak hem de zarflı DNA virüslerine karşı etkili olduğunu göstermiştir [169, 170]. Hümik asit benzeri polimerlerin insan immün yetmezlik virüs tip-1 (HIV-1), tip-2 (HIV-2) ve sitomegalovirüsleri (CMV) seçici olarak inhibe ettiği bildirilmiştir. Hümik asitlerin virüsler üzerindeki inhibitör etkisi virüs replikasyonunun erken evresinde (virüslerin hücrelere tutunması sırasında) ortaya çıkar [179, 180].

Tavşanlarda yapılan bir çalışmada, tavşanlarınkonjüktivalarınaenfeksiyöz ajan ile birlikte aynı anda sentetik hümik asit uygulanmış ve çalışmanın sonucunda HSV-1 ile enfekte olmuş tavşanların kornealarındaki lezyonların sayısında önemli derecede azalma elde edilmiştir. Fakat 1 ve 24 saat sonra uygulanan hümik asitin lezyon gelişimi üzerinde herhangi bir etkisi bulunmamıştır [181].

Başka bir çalışmada fare kulağında deneysel olarak oluşturulmuş herpes enfeksiyonu topikal hümik asit türevi bir madde uygulanılarak tedavi edilmiş ve sonuçlar hümik asit türevi maddenin enfeksiyonu önemli derecede azalttığını veya tamamen baskıladığını göstermiştir [182].

Yine yapılan başka bir çalışmada, hümik asit influenza virüsünün endonükleaz aktivitesini inhibe ederek anti-gribal etki gösterdiği bulunmuştur [183].

2.3.2.3. Anti-Enflamatuvar Etkileri

Doğal ve sentetik hümik asitler araşidonik asit döngüsünün lipoksijenaz yolunu inhibe ederek anti-enflamatuvar etki gösterirler. Araşidonik asit hücre membranının tamamlayıcı bir parçasıdır ve lökotrienler, tromboksan ve prostasiklin gibi eikozanoid kökenli enflamasyon mediatörlerinin sentezi için bir substrattır [33]. Bu, hümik asitlerin anti-enflamatuvar özelliğini açıklayabilir. Taugner ve ark. [184] ratlarda yaptıkları bir çalışmada sodyum humatın tedavi edilmemiş kontrollerle kıyaslandığında ödem gelişimini önemli derecede azalttığını bulmuşlardır. Yine aynı çalışma dizaynında yapılan bir araştırmada, turbadan izole edilen amonyum humat, sodyum humatın anti-enflamatuvar etkinliğini arttırdığını bulmuşlardır. Bu araştırmalar sonucunda anti-enflamatuvar etkisinin asetilsalisilik asit ve aminofenazon kadar etkili olduğu bulunmuştur [185]. Hümik asitlerin sadece enflamasyonu hafifletmediği, ayrıca zarar görmüş kemik ve tendonları tamir etmek için kollajen liflere tutunduğu bildirilmiştir. Tendonların kuvvetini %75'e kadar arttırdığı gösterilmiştir [186].

Ratlarla yapılan bir diğer çalışmada 50 mg/kg'lık hümik asit dozunun enflamasyonu baskıladığı bulunmuştur [187]. Gau ve ark. [188] hümik asitlerin intersellüler adezyon molekül-1 (ICAM-1), vasküler adezyon molekül-1 (VCAM-1) ve E-selektin gibi protein tip enflamatuvar mediatörlerinin salınımını inhibe ettiğini göstermişlerdir.

2.3.2.4.Kan Parametreleri Üzerine Etkileri

Buczko ve ark. [189] insanlarda 100-300 mg/kg hümik asit dozunun kanama zamanı, pıhtılaşma zamanı, trombin zamanı ve platelet agregasyonu üzerine bir etkisinin bulunmadığını bildirmiştir. Ayrıca kırmızı kan hücreleri(RBC) ve hemoglobin düzeyleri üzerine etkisi bulunmamıştır [190]. Literatür hümik asit varlığında kırmızı kan hücrelerinin daha fazla oksijen taşıma kapasitesine sahip olduğunu göstermektedir. Fazla oksijen taşınmasının sonucu olarak yara iyileşmesi daha hızlı olmaktadır [38]. Dabovich ve ark. [191] hümik asit ürünü olan Promax'ın nötrofil aktivitesini stimüle ettiğini ve böylece bakteriyel patojenlere karşı koruma sağlanabildiğini ve akut bakteriyel enfeksiyon esnasında mortalitenin azaltılabildiğini bildirmişlerdir.

2.3.2.5. Mineral Transferi Üzerine Etkileri

Hümik asit hücre duvarı geçirgenliğini arttıran bir dilatör olarak rol oynar. Bu artmış geçirgenlik kandan kemik ve hücrelere mineral transferini kolaylaştırmaktadır. Yapılan bir çalışma hümik asitin sığır kaynaklı greftlerin kalsifikasyonunu %16 oranında arttırdığını göstermiştir [186].

2.3.2.6. İmmün Sistem Üzerine Etkileri

Hümik asitler immünomodülatör etkisi dolayısıyla *Escherichia coli* gibi patojenlere karşı immün sistemi geliştirerek koruma sağlamaktadır [38]. Yapılan bir çalışmada hümik asit ürünleri tümör hücrelerinin büyümesini baskılamıştır. Mekanizması tam olarak anlaşılmamakla birlikte, antitümör aktivitesi doğal bağışıklığı arttırmasıyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir [192].

Vucskits ve ark. [193] hümik asit ve fulvik asit diyetinin ratlarda hem immün yanıtı arttırdığını hem de immün yanıt süresini uzattığını göstermişlerdir. Ayrıca plazmada antikor düzeyini de arttırdığını bildirmişlerdir.

2.3.3. Hümik Asit İçeriği

Çalışmamızda kullandığımız hümik asit turbadan elde edilmiştir. İçeriği aşağıda gösterilmiş olup, içerisinde radyoaktif madde tespit edilmemiştir. Ağır metaller ise eser miktarda olup güvenlik dozunun oldukça altındadır.

Hümik asitler	%15
Organik C	%28,5
pH	11–12
Yoğunluk	1.12 kg/L
Kasyon Değişim Kapasitesi	400–600 mval/100g
Koloit partiküllerinin boyutu	<100 µm
Renk	Koyu kahve-siyah
Ürün türü	Sıvı süspansiyon
Enerji	195 kcal/100 g
Protein	2,6 g/100 g
Yağ	yok
Karbonhidrat	46,1 mg/kg
Demir (Fe)	6776 mg/kg
Çinko (Zn)	40,2 mg/kg
Magnezyum (Mg)	2017 mg/kg
Selenyum (Se)	18587 µg /kg
Molibden (Mo)	2300 µg /kg

Radyoaktif elementler	yok
Ağır metaller	eser miktarda

2.3.4. Sitotoksosite

Bilim adamları hümik asidin kan, kardiyovasküler sistem, endokrin sistem ve diğer önemli organlara zararının bulunmadığını bildirmişlerdir [38]. Yapılan bir çalışmada doğal hümik asidin kemik iliği hücrelerine önemli bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir [194].

Dos Santos ve ark. [195] oral yolla verilen 512 mg/kg'lık hümik asit dozunun ratlarda toksik olmadığını bildirmişlerdir.

Farelerde LD₅₀ (lethal dose, ortalama öldürücü doz, %50 öldürücü doz) değeri 11500 mg/kg olarak belirlenmiştir. Fakat 163.5-205.8 mg/kg dozda farelerde parenteral yolla ve tavşanlarda karın zarına enjekte edildiği zaman toksiktir. Farelerde 30 gün boyunca 100 mg/kg/gün ve köpeklerde 90 gün boyunca 1000 mg/kg/gün oral yolla hümik asit verilmesi herhangi bir toksik etkiye neden olmamıştır. Ayrıca 50-150 mg/kg konsantre hümik asit ve 500-15000 mg/ml sodyum humat insan fibroblastları ile hamster ve tavşan böbrek hücrelerinde herhangi bir toksik etkiye neden olmamıştır [153].

Rensburg ve ark.'nın [196] yaptıkları bir çalışmada 30 gün boyunca günlük 1000 mg/kg hümik asit solüsyonunun ratlarda herhangi bir toksik etki göstermediğini tespit etmişlerdir. Yine aynı çalışmanın devamında hamile ratlara hamileliklerinin 5. ve 17. günlerinde verilen 500 mg/kg hümik asit solüsyonunun herhangi bir teratojenik ya da sitotoksik etkiye neden olmadığı gözlenmiştir. 30 günlük çalışma süresince hiçbir ratta ölüme rastlanmamıştır.

Domuzlara 30 gün boyunca 500 ve 2000 mg/kg/gün, koyunlara 30 gün boyunca 1000 ve 2000 mg/kg/gün oral yolla hümik asit verilmesi sonucunda kan plazmasında, karaciğerde, kaslarda ve böbrekte hümik asite rastlanmamıştır [153].

3. MATERYAL METOT

Bu araştırma için Cumhuriyet Üniversitesi Hayvan Deneyleti Etik Kurulu tarafından 06.10.2011 tarih ve 253 sıra numarası ile onay alındı. Denek olarak 12 haftalık, ortalama ağırlıkları 280-300 gr olan Wistar cinsi 62 adet erkek rat kullanıldı. Deney hayvanlarının seçiminde genel sağılıklarının iyi olması ve önceden üzerinde herhangi bir çalışma yapılmamış olması gibi şartlara özen gösterildi. Her bir gruptaki ratlar ayrı kafeslerde aynı şartlarda beslendi. Tüm ratlar 12 saat gece/gündüz, $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklık ve %40-60 nem oranı gözetilerek standart diyet ve su ile beslendiler. Ratlar çalışma öncesi yeni yaşam koşullarına hazırlanması için 10 gün metal kafeslerde tutuldu. Çalışmamızın deney aşamaları Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

3.1. Çalışma Grupları

Ratlarda deneysel işlemler için sağ mandibuler birinci molar dişler seçildi. Denekler 8 gruba ayrıldı.

1. grup kontrol grubu.(K, n=6)

2. grup ligatürlü deneysel periodontitis, ligatürlü (pozitif) kontrol grubu.(LK, n=8)

3. grup ligatürlü deneysel periodontitis + 14 gün boyunca günlük lokal olarak 20 mg/kg hümik asit. (L-20, n=8)

4. grup ligatürlü deneysel periodontitis + 14 gün boyunca günlük lokal olarak 80 mg/kg hümik asit. (L-80, n=8)

5. grup ligatürlü deneysel periodontitis + 14 gün boyunca günlük lokal olarak 150 mg/kg hümik asit. (L-150, n=8)

6. grup ligatürlü deneysel periodontitis + 14 gün boyunca günlük sistemik olarak (gastrik gavaj) 20 mg/kg hümik asit. (S-20, n=8)

7. grup ligatürlü deneysel periodontitis + 14 gün boyunca günlük sistemik olarak (gastrik gavaj) 80 mg/kg hümik asit. (S-80, n=8)

8. grup ligatürlü deneysel periodontitis + 14 gün boyunca günlük sistemik olarak (gastrik gavaj) 150 mg/kg hümik asit. (S-150, n=8)

3.2. Çalışma Prosedürü

3.2.1. Deneysel Periodontitis Oluşturulması

Rompun (Bayer, İstanbul, Türkiye) 5 mg/kg s.c. veya i.m. ve Ketalar (Pfizer, New York, ABD) 30 mg/kg i.m. kullanılarak denekler anestezi altına alındı. Tüm ratların sağ mandibuler birinci molar dişlerine steril 4/0 ipek suture (Doğsan İlaç Sanayi, İstanbul, Türkiye) subgingival olarak yerleştirilerek bu bölgede plak retansiyonu sağlamak koşuluyla deneysel periodontitis oluşturuldu. Süturlar 14 gün boyunca günlük kontrol edildi.

3.2.2. Hümik Asit Uygulaması

Ratların kiloları göz önünde tutularak her bir gruptaki ratlar için uygun hümik asit konsantrasyonu hazırlandı. Lokal uygulama yapılacak gruplar için belirlenen hümik asit miktarı (0.5 cc) küçük pamuk peletlere emdirilerek suture geçirilen dişin etrafında 1 dakika süre ile tutuldu. Sistemik uygulama yapılacak gruplar için belirlenen hümik asit miktarı (0.5 cc) gastrik gavaj yolu ile günde bir kez olmak üzere uygulandı.

3.2.3. Sakrifikasyon

Çalışmanın 15. gününde anestezi altında tüm ratların mandibuler sağ birinci molar dişlerinin bukkal dişetinden 2x2 mm'lik dişeti biyopsileri alındı. Kardiyak ponksiyon ile 4 cc kan alınarak jelli tüplere (Vacutest, Kima, İtalya) konuldu. Daha sonra 200 mg/kg i.p. pentotal sodyum (Ekipental, Tümekip İlaç San, İstanbul, Türkiye) enjeksiyonu ile sakrifiye edilen ratların mandibulaları çıkarıldı. Çıkarılan mandibulalar %10'luk formaldehit solüsyonunda fikse edildi.

3.2.4. Ratlardan Serum Elde Edilmesi

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

3.2.5. Dişeti Biyopsilerinin Biyokimyasal Analizi

Deneysel araştırmanın bu aşaması Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

Dişeti homojenatı elde etmek için ratların sağ mandibuler birinci molar bölgesinden 2x2 mm ebatlarında alınan dişeti örnekleri hassas terazide tartılarak standardize edildi. Dişeti örnekleri 10 mg doku/ml fosfat tampon+proteaz inhibitör solüsyon dilüsyonu elde etmek için bir proteaz içeren (5 µg/ml aprotinin ve 1 mM EDTA) yeterli hacimde fosfat tampon solüsyonuna (4°C, pH7.0) yerleştirildi. Dişeti örnekleri homojenizasyon, ultrasonikasyon ve ultrasentrifügasyon işlemlerine tabi tutularak süpernatant elde edildi. Örnekler teflon-cam tip homojenizatörün (B. Braun, Melsungen, Almanya) en yüksek ayarında 30 saniye homojenize edildi. Homojenizasyon sonrası örnekler 2 kez dondurma-çözme işlemine tabi tutuldu. Elde edilen homojenatlar ultrasonikatörün (Thermo Fisher Scientific, ABD) 7 ayarında 15-20 mikronda 10-20 saniye aralıklar ile 3 kez ultrasonikasyona tabi tutuldu. Son olarak 15.000 rpm'de 16 dakika santrifüj edildi. Tüm bu uygulamalar 0-4°C'de gerçekleştirildi. Elde edilen süpernatantlar IL-1β ve IL-10 ELISA analizi için -80°C'de bekletildi.

Deneysel araştırmanın morfolometrik değerlendirilmesi tek bir araştırmacı tarafından gerçekleştirildi.

3.2.6. Morfometrik Değerlendirme

Alveoler kemik kaybı her bir dişin altı farklı bölgesinden mine-sement sınırı ile alveoler kret tepesi arasındaki mesafe ölçülerek belirlendi. Her bir dişin ortalaması o diş için alveoler kemik kaybı miktarı olarak alındı. Histopatolojik işlemlerden önce mandibulalar metilen mavisine batırılarak stereomikroskop (Stemi DV4, Carl Zeiss, Almanya) altında x25 büyütmede mikroskoba uyumlu bir fotoğraf makinesi (Canon EOS 1000, Tokyo, Japonya) ile fotoğraflandı. Çekilen bu fotoğraflar üzerinden bir görüntü analiz programı (Clemex Vision Lite, Quebec, Kanada) ile morfometrik ölçümler yapıldı.

Deneysel araştırmanın histopatolojik değerlendirmesi Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

3.2.7. Histopatolojik İşlemler

Histopatolojik analizler için mandibulalar %10'luk formaldehit solüsyonunda 24 saat süresince tespit edildi. Örnekler %10'luk formik asitte dekalsifiye edildikten sonra parafine gömülecek çalışma bölgeleri bistüri aracılığıyla dikkatli bir biçimde çıkarıldı. Distile su ile yıkanan örnekler derecesi giderek artan alkol serileri ile dehidratasyonu takiben, ksilen ile şeffaflaştırma işlemi uygulanarak parafine gömüldü. Bloklardan alınan 5 µm kalınlıktaki seri kesitler histopatolojik değerlendirme için 1 gece 60°C etüvde bekletilerek ksilende deparafinize edildikten sonra rehidratasyon işlemi uygulanarak Hematoksilen-Eozin (HE) ile boyandı. Boyama işleminden sonra kesitler ışık mikroskobu (Nikon Eclipse 80i, Nikon, Tokyo, Japonya) altında x40, x100, x200 ve x400 büyütmelerde değerlendirildi. Kesitlerde periodontal dokularda enflamatuvar hücre infiltrasyonu, kollajen lif demetleri, osteoblastik aktivite ve alveol kemik ile interdental septumdaki osteoklast sayıları incelendi. Enflamatuvar hücre infiltratı semi-kantitatif bir değerlendirme ile gözle görülebilir infiltrat yokluğu (0), hafif derecede enflamatuvar hücre varlığı (1), orta derecede enflamatuvar hücre varlığı (2) ve şiddetli derecede enflamatuvar hücre varlığı (3) olarak skorlandı. Osteoklastlar morfolojileri dikkate alınarak sayıldı. Osteoblastik aktivitenin değerlendirilmesi için osteoid ve osteoblastlar ile çevrelenmiş aktif kemik yapımı olan alanlar belirlendi. Osteoblastik aktivite semi-kantitatif bir değerlendirme ile aktivite

yokluğu (0), hafif ölçüde aktivite varlığı (1), orta ölçüde aktivite varlığı (2) ve yoğun aktivite varlığı (3) olarak skorlandı. Fibrozis varlığı ise gözle görülebilir fibrozis yokluğu (0), hafif derecede fibrozis varlığı (1), orta derecede fibrozis varlığı (2) ve şiddetli derecede fibrozis varlığı (3) olarak skorlandı.

3.2.8. IL-10 ELISA Kitinin Hazırlanması

Rat IL-10 ELISA kit (Invitrogen, Kaliforniya, A.B.D.)

Standart Kontrolleri

Standart'ın Dilüsyonu

Standart şişesi üzerinde yazan miktarda Standart Dilüent Buffer ile sulandırıldı. (20.000 pg/ml) Karıştırıldıktan sonra 10 dakika bekletildi.

Streptavidin (SAV)-HRP Hazırlanması

Streptavidin-HRP; 1strip için 10 µl Streptavidin-HRP + 1 ml Streptavidin-HRP Çalışma Solüsyonu hazırlandı.

Yıkama Solüsyonunun Dilüsyonu

50 ml Yıkama solüsyonu + 1250 ml distile su hazırlandı.

Deney Prosedürü

1. Sıfır standart için Standart dilüent buffer kullanıldı. Kromojen Blank kuyucuğu boş bırakıldı.
2. Kuyucuklara 100 µl standart solüsyonundan konuldu.

3. Diğer kuyucuklara 50 µl standart dilüent buffer ve çalışılacak örneklerden 50 µl konuldu.
4. Kromojen hariç tüm kuyucuklara 50 µl biotinylated Rt IL-10 Biotin Konjugat ilave edildi. Plate karıştırıldı.
5. Üzeri kapatılarak iki saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
6. Dört defa yıkandı.
7. Kromojen hariç tüm kuyucuklara 100 µl Streptavidin-HRP Çalışma Solüsyonu aktarıldı.
8. 30 dakika oda ısısında inkübe edildi.
9. Dört defa yıkandı.
10. Tüm kuyucuklara 100 µl Kromojen konuldu.
11. 30 dakika oda ısısında inkübe edildi.
12. 100 µl stop solüsyonu eklendi.
13. 450 nm dalga boyunda okundu.
14. Standartlara göre grafik çizildi.
15. Örnekler bu grafiğe göre değerlendirildi.
16. Çıkan sonuçlar iki ile çarpıldı.

3.2.9. IL-1β ELISA Kitinin Hazırlanması

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

Standart Kontrolleri

Yıkama Solüsyonu

50 ml yıkama solüsyonu + 1000 ml distile su hazırlandı.

Assay Buffer

5 ml assay buffer + 100 ml distile su hazırlandı.

Biotin Konjugat

12 strip için; 60 µl Biotin konjugat + 5.94 ml assay buffer hazırlandı.

Streptavidin-HRP

12 strip için; 60 µl Streptavidin-HRP + 11.94 ml assay buffer hazırlandı.

Rat IL-1 β Standart

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

Deney Prosedürü

1. Mikro plak kuyucukları iki defa yıkandı.
2. Standartlardan kuyucuklara 100 µl aktarıldı.
3. Blank kuyucuğuna 100 µl örnek dilüent eklendi.
4. Örnek kuyucuklarına 50 µl örnek dilüent eklendi.
5. Örneklerden 50 µl aktarıldı.
6. Hazırlanan Biotin Konjugattan 50 µl aktarıldı.
7. Üzeri kapatılıp 2 saat oda ısısında inkübe edildi.
8. Sonra üç defa yıkandı.
9. 100 µl sulandırılan Streptavidin-HRP eklenerek üzeri kapatıldı.
10. Oda ısısında 1 saat inkübe edildi.
11. Üç defa yıkandı.

12. 100 µl TMB Substrat Solüsyonu eklendi.
13. 10 dakika oda ısısında inkübe edildi.
14. 100 µl stop solüsyonu eklendi.
15. 450 nm dalga boyunda okundu.
16. Standartlara göre grafik çizildi.
17. Örnekler bu grafiğe göre değerlendirildi.
18. Çıkan sonuçlar iki ile çarpıldı.

3.2.10. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmamızın verileri SPSS (Ver:14.0) programına yüklenerek istatistiksel analiz yapıldı. Parametrik varsayımlar yerine getirilemediğinden gruplar arası farklılıkların belirlenmesinde Kruskal-Wallis testi, anlamlı bulunan sonuçlarda grupların ikişerli karşılaştırılmasında Man-Whitney U testi kullanıldı. Verilerimiz tablolarda aritmetik ortalama \pm standart sapma, minimum, maksimum ve ortanca olarak belirtilip yanılma düzeyi 0.05 olarak alındı.

4. BULGULAR

Deney süresince yerleştirilen ligatürlerde herhangi bir kopma ya da ayrılma gözlenmedi. Ayrıca deney süresince hiçbir grupta komplikasyon (kilo kaybı vs.) görülmedi. Histopatolojik değerlendirmede L-20 grubundaki bir örnekte HE boyamasında kesit net görünmediğinden değerlendirmeye alınmadı.



Şekil 7. *Ratların sağ mandibuler birinci molar dişlerine yerleştirilmiş olan 4/0 ipek ligatürün görüntüsü.*

4.1. Morfometrik Ölçümler

Gruplara ait alveol kemik kaybı ölçümleri karşılaştırıldığında gruplar arası farklılık önemli bulundu ($p<0.05$). (Çizelge-1) Gruplara ait değerler ikişerli olarak karşılaştırıldığında;

K grubundaki alveoler kemik kaybı miktarı LK, L-80 ve S-20 gruplarına oranla anlamlı oranda düşüktü ($p<0.05$).

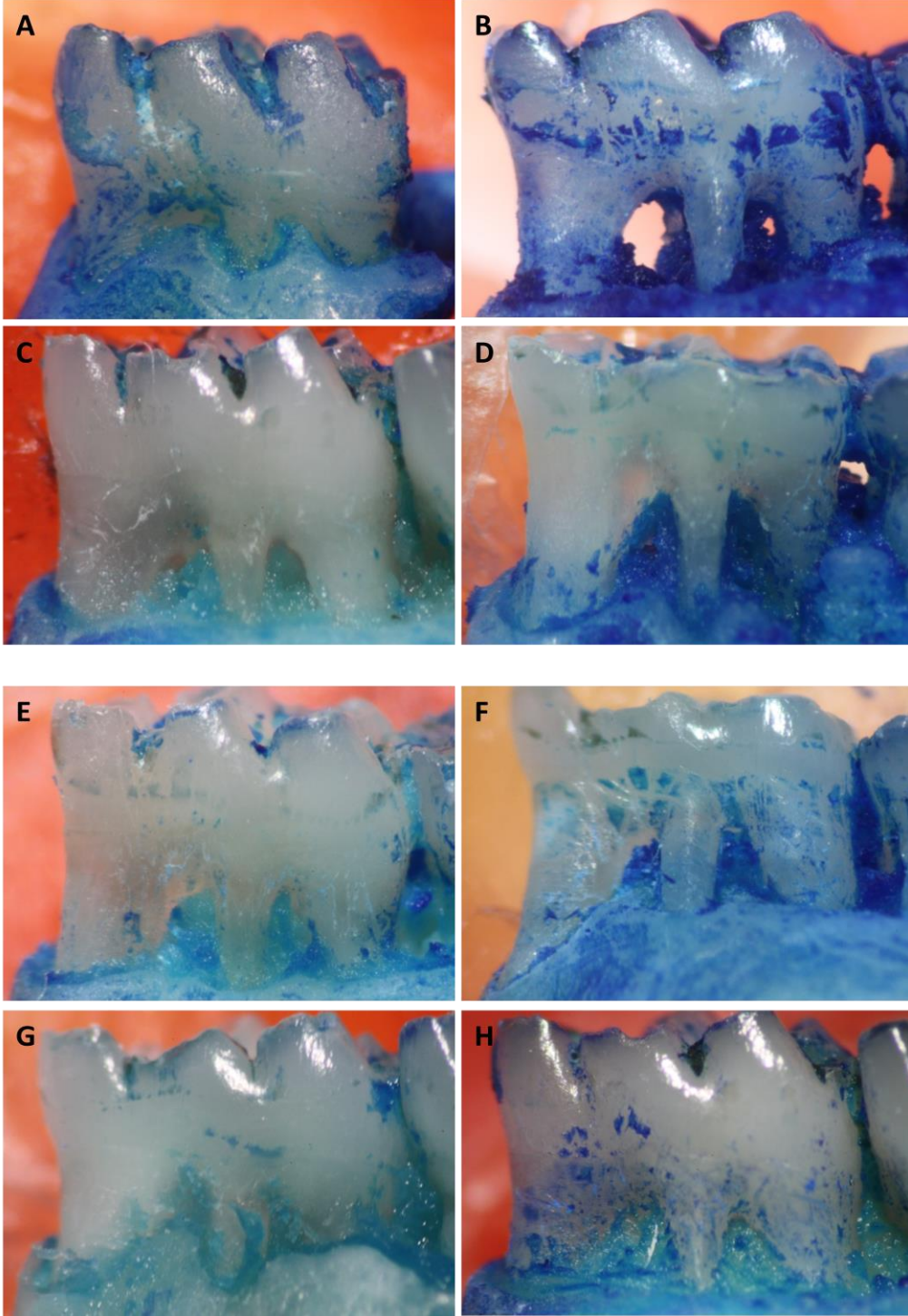
LK grubundaki alveoler kemik kaybı miktarı L-20, L-150, S-80 ve S-150 gruplarına göre önemli düzeyde yüksek bulundu ($p<0.05$).

L-80 grubunda S-80 ve S-150 gruplarına göre daha fazla alveoler kemik kaybı tespit edildi ($p<0.05$).

L-20 ve S-20 gruplarındaki alveoler kemik kaybı miktarı S-80 grubuna oranla daha fazla bulundu ($p<0.05$).

Diğer gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p>0.05$).

Tüm gruplarda hümitik asit miktarı alveoler kemik kaybı miktarını azaltırken özellikle S-80 ile S-150 grubundaki alveoler kemik kaybı miktarının kontrol grubuna yakın olması dikkat çekicidir.

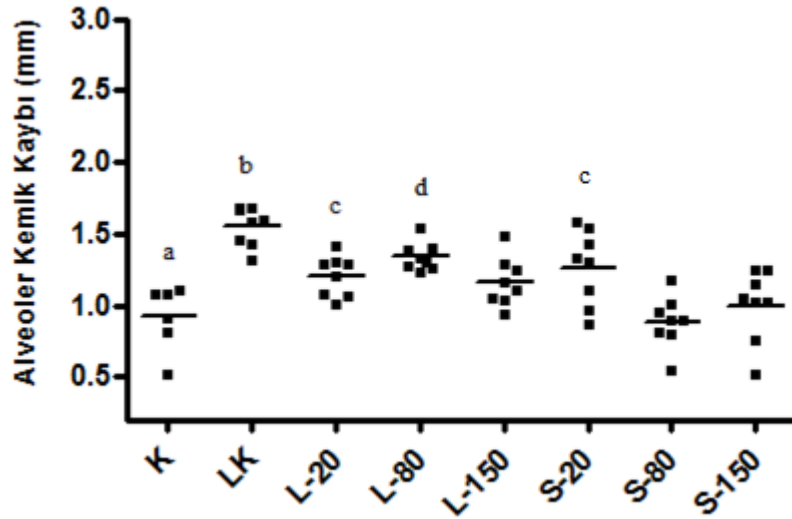


Şekil 8. Gruplara ait alt sağ birinci molar dişlerin stereomikroskop görüntüsü (x25). A: K grubu, B: LK grubu, C: L-20 grubu, D: L-80 grubu, E: L-150 grubu, F: S-20 grubu, G: S-80 grubu, H: S-150 grubu.

Çizelge 1. Gruplara ait alveoler kemik kaybı ortalamaları ve ortanca değerleri.

Gruplar	Ortalama Alveoler Kemik Kaybı	
	$\bar{X} \pm S$	(Min – Maks) Ortanca
K	0.91 ± 0.22 ^a	(0.51 – 1.10) 0.99
LK	1.54 ± 0.13 ^b	(1.30 – 1.67) 1.59
L-20	1.20 ± 0.14 ^c	(1.00 – 1.41) 1.24
L-80	1.34 ± 0.09 ^d	(1.23 – 1.54) 1.31
L-150	1.16 ± 0.17	(0.94 – 1.48) 1.13
S-20	1.26 ± 0.26 ^c	(0.86 – 1.58) 1.31
S-80	0.88 ± 0.18	(0.55 – 1.17) 0.89
S-150	0.99 ± 0.24	(0.52 – 1.24) 1.03
Sonuç	KW=37.59 p=0.001* önemli	

*p<0.05 önemli



Şekil 9. Gruplara ait alveoler kemik kaybı ortalamaları.

^ap<0.05 LK, L-80 ve S-20 gruplarından farklı; ^bp<0.05 L-20, L-150, S-80 ve S-150 gruplarından farklı; ^cp<0.05 S-80 grubundan farklı; ^dp<0.05 S-80 ve S-150 gruplarından farklı

4.2. Serum ve Dişeti Homojenati IL-10 ve IL-1β Değerleri

Gruplara ait serum IL-10 değerleri karşılaştırıldığında gruplar arasındaki farklılık önemli bulundu ($p<0.05$). (Çizelge-2) Gruplara ait değerler ikişerli karşılaştırıldığında;

K grubundaki serum IL-10 düzeyi LK, L-80 ve S-20 gruplarına göre istatistiksel olarak yüksek iken, S-80 grubuna göre anlamlı oranda düşük bulundu ($p<0.05$).

S-80 grubundaki serum IL-10 düzeyi diğer gruplara göre önemli oranda yüksek bulundu ($p<0.05$).

Diğer gruplar arasındaki farklılık anlamlı bulunmadı ($p>0.05$).

S-80 grubunun serum IL-10 düzeyini anlamlı oranda arttırdığı tespit edildi. Ayrıca hümitik asit uygulamasının LK grubuyla kıyaslandığında diğer tüm gruplarda serum IL-10 düzeyini arttırdığı bulundu.

Çizelge 2. Gruplara ait Serum IL-10 düzeyleri.

Gruplar	Ortalama	Standart Sapma	Ortanca	Minimum	Maksimum
K	21.44 ^a	12.08	22.35	7.81	33.25
LK	3.90	2.20	3.19	2.13	7.10
L-20	14.37	10.39	9.94	7.81	29.80
L-80	4.97	2.24	4.61	2.84	7.81
L-150	8.34	2.34	8.16	5.68	11.36
S-20	5.50	3.68	4.26	2.84	10.65
S-80	39.12 ^b	7.08	39.00	32.75	45.75
S-150	9.94	4.05	9.58	5.68	14.91
Sonuç	KW= 22.45 p=0.002*		*p<0.05 önemli		

^a $p<0.05$ LK, L-80 ve S-20 gruplarından farklı; ^b $p<0.05$ tüm gruplardan farklı

Gruplara ait dişeti homojenatı IL-10 değerleri karşılaştırıldığında gruplar arasındaki farklılık önemli bulundu ($p<0.05$). (Çizelge-3) Gruplara ait değerler ikişerli karşılaştırıldığında;

K grubunda dişeti homojenatı IL-10 düzeyi LK, L-20, L-80 ve L-150 gruplarına göre anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p<0.05$).

LK ve L-80 gruplarında dişeti homojenatı IL-10 düzeyinin S-20, S-80 ve S-150 gruplarından düşük olduğu tespit edildi ($p<0.05$).

L-20 ve L-150 gruplarında dişeti homojenatı IL-10 düzeyi S-20 ve S-80 gruplarına göre önemli oranda düşüktü ($p<0.05$).

Diğer gruplar arasındaki farklılık anlamlı bulunmadı ($p>0.05$).

Dişeti homojenatı IL-10 sitokin düzeyleri karşılaştırıldığında; S-80 grubunda IL-10 düzeyi diğer gruplara göre daha yüksek oranda tespit edildi.

Çizelge 3. Gruplara ait Dişeti Homojenatı IL-10 düzeyleri.

Gruplar	Ortalama	Standart Sapma	Ortanca	Minimum	Maksimum
K	89.80 ^a	18.60	96.47	62.50	103.78
LK	22.71 ^b	20.07	22.13	2.84	43.75
L-20	35.77 ^c	12.92	34.31	22.70	51.75
L-80	29.52 ^b	12.65	33.25	11.36	40.25
L-150	36.94 ^c	12.80	33.50	25.54	55.25
S-20	70.45	4.04	70.02	66.37	75.40
S-80	91.41	16.42	84.86	80.13	115.82
S-150	66.84	8.17	65.67	59.75	76.26
Sonuç	KW=25.46 p=0.001*		*p<0.05 önemli		

^a $p<0.05$ LK, L-20, L-80 ve L-150 gruplarından farklı; ^b $p<0.05$ S-20, S-80 ve S-150 gruplarından farklı; ^c $p<0.05$ S-20 ve S-80 gruplarından farklı.

Gruplara ait serum IL-1 β değerleri karşılaştırıldığında gruplar arasındaki farklılık önemli bulundu ($p<0.05$). (Çizelge-4) Gruplara ait değerler ikişerli karşılaştırıldığında;

Kontrol grubunda serum IL-1 β düzeyi diğer tüm gruplardan istatistiksel olarak düşük bulundu ($p<0.05$).

LK grubunda en yüksek serum IL-1 β düzeyi tespit edildi. LK grubu ile L-20, L-150, S-20, S-80 ve S-150 grupları arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$).

L-20, L-80, L-150 ve S-20 gruplarında serum IL-1 β düzeyi S-80 ve S-150 gruplarından istatistiksel olarak daha yüksek bulundu ($p<0.05$).

Diğer gruplar arasındaki farklılık önemli değildi ($p>0.05$).

Özellikle S-80 grubu ile S-150 grubunda diğer ligatürlü gruplarla karşılaştırıldığında serum IL-1 β düzeyi daha düşük oranda tespit edildi.

Çizelge 4. Gruplara ait Serum IL-1 β düzeyleri.

Gruplar	Ortalama	Standart Sapma	Ortanca	Minimum	Maksimum
K	4.68 ^a	2.10	5.35	1.79	6.25
LK	96.95 ^b	6.86	97.27	88.26	105.00
L-20	56.61 ^c	11.85	58.91	42.28	66.36
L-80	87.61 ^c	5.68	87.61	81.82	93.41
L-150	56.84 ^c	7.01	57.90	47.79	63.79
S-20	71.68 ^c	6.76	68.30	68.30	81.82
S-80	32.48	10.56	28.57	25.00	47.79
S-150	35.02	12.13	35.43	21.43	47.79
Sonuç	KW=29.07	$p=0.001^*$	$*p<0.05$ önemli		

^a $p<0.05$ diğer tüm gruplardan farklı; ^b $p<0.05$ L-20, L-150, S-20, S-80 ve S-150 gruplarından farklı; ^c $p<0.05$ S-80 ve S-150 gruplarından farklı.

Gruplara ait dişeti homojenati IL-1 β değerleri karşılaştırıldığında gruplar arasındaki farklılık önemli bulundu ($p<0.05$). (Çizelge-5) Gruplara ait değerler ikişerli karşılaştırıldığında;

K grubunda dişeti homojenati IL-1 β düzeyi LK, L-20, L-80, S-20 ve S-150 gruplarına göre anlamlı şekilde düşük bulundu ($p<0.05$).

LK grubunda dişeti homojenati IL-1 β düzeyinin en yüksek olduğu tespit edildi. L-20, L-150, S-20, S-80 ve S-150 gruplarından istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p<0.05$).

L-20 grubunda dişeti homojenati IL-1 β düzeyi L-80 ve S-20 gruplarından düşük, S-80 grubundan ise istatistiksel olarak yüksek bulundu ($p<0.05$).

L-80 ve S-20 gruplarında L-150, S-80 ve S-150 gruplarına göre daha yüksek IL-1 β düzeyi tespit edildi ($p<0.05$).

Diğer gruplar arasındaki farklılık önemli değildi ($p>0.05$).

S-80 grubunun dişeti homojenati IL-1 β düzeyini istatistiksel olarak önemli oranda azalttığı saptandı. Bu değer kontrol grubuyla yakın değerlerde olması dikkat çekicidir.

Çizelge 5. Gruplara ait Dişeti Homojenati IL-1 β düzeyleri.

Gruplar	Ortalama	Standart Sapma	Ortanca	Minimum	Maksimum
K	6.02 ^a	3.59	6.25	1.79	9.82
LK	63.69 ^b	5.17	64.11	56.98	69.58
L-20	25.89 ^c	3.17	26.79	21.43	28.58
L-80	54.57 ^d	11.24	55.79	42.28	64.43
L-150	21.65	2.56	22.77	17.86	23.22
S-20	45.38 ^d	14.91	45.03	27.68	63.79
S-80	8.03	2.18	7.59	6.25	10.72
S-150	23.66	3.45	23.66	19.65	27.68
Sonuç	KW=28.01	p=0.001*	*p<0.05 önemli		

^a $p<0.05$ LK, L-20, L-80, S-20 ve S-150 gruplarından farklı; ^b $p<0.05$ L-20, L-150, S-20, S-80 ve S-150 gruplarından farklı; ^c $p<0.05$ L-80, S-20 ve S-80 gruplarından farklı; ^d $p<0.05$ L-150, S-80 ve S-150 gruplarından farklı.

4.3. Histopatolojik Değerlendirme

4.3.1. Osteoblastik Aktivite

Gruplara ait osteoblastik aktivite değerleri karşılaştırıldığında gruplar arasındaki farklılık önemli bulundu ($p < 0.05$). (Çizelge-6) Gruplara ait değerler ikişerli karşılaştırıldığında;

K grubunda osteoblastik aktivite diğer tüm gruplardan istatistiksel olarak daha düşük bulundu ($p < 0.05$).

LK, L-20, L-80, L-150 ve S-20 gruplarında osteoblastik aktivite S-80 ve S-150 gruplarına göre önemli oranda düşük bulundu ($p < 0.05$).

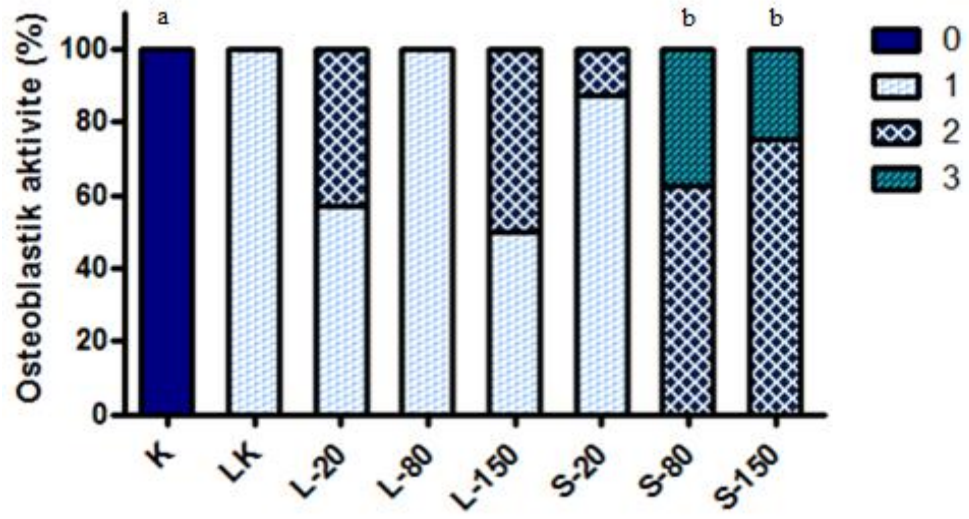
Diğer gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0.05$).

Osteoblastik aktivite en çok S-80 ve S-150 gruplarında elde edildi. Bu iki grupta yoğun ve yeni kemik yapı alanları gözlemlendi.

Çizelge 6. Gruplara ait osteoblastik aktivite değerleri.

Gruplar	Osteoblastik Aktivite	
	$\bar{X} \pm s$	(Min – Maks) Ortanca
K	0.00 ± 0.00^a	(0.00 – 0.00) 0.00
LK	1.00 ± 0.00	(1.00 – 1.00) 1.00
L-20	1.43 ± 0.53	(1.00 – 2.00) 1.00
L-80	1.00 ± 0.00	(1.00 – 1.00) 1.00
L-150	1.50 ± 0.53	(1.00 – 2.00) 1.50
S-20	1.13 ± 0.35	(1.00 – 2.00) 1.00
S-80	2.38 ± 0.51^b	(2.00 – 3.00) 2.00
S-150	2.25 ± 0.46^b	(2.00 – 3.00) 2.00
Sonuç	KW=47.28	p=0.001* önemli

* $p < 0.05$ önemli



Şekil 10. Gruplara ait osteoblastik aktivite dağılımı (%).

^a $p < 0.05$ diğer tüm gruplardan farklı; ^b $p < 0.05$ LK, L-20, L-80, L-150 ve S-20 gruplarından farklı.

4.3.2. Osteoklast Sayısı

Gruplara ait osteoklast sayısı değerleri karşılaştırıldığında gruplar arasındaki farklılık önemli bulundu ($p<0.05$). (Çizelge-7) Gruplara ait değerler ikişerli karşılaştırıldığında;

K grubunda osteoklast sayısı LK, L-80, L-150 ve S-20 gruplarına göre istatistiksel olarak daha düşük bulundu ($p<0.05$).

LK grubunda osteoklast sayısı L-20, L-150, S-80 ve S-150 gruplarına göre anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p<0.05$).

L-20 grubunda osteoklast sayısı L-80 ve S-20 gruplarına göre daha düşük tespit edildi ($p<0.05$).

L-80 grubunda osteoklast sayısı L-150, S-80 ve S-150 gruplarına göre daha fazla bulundu ($p<0.05$).

L-150 grubunda S-20 grubuna oranla daha düşük sayıda osteoklast tespit edildi ($p<0.05$).

S-20 grubunda osteoklast sayısı S-80 ve S-150 gruplarına göre istatistiksel olarak daha yüksek bulundu ($p<0.05$).

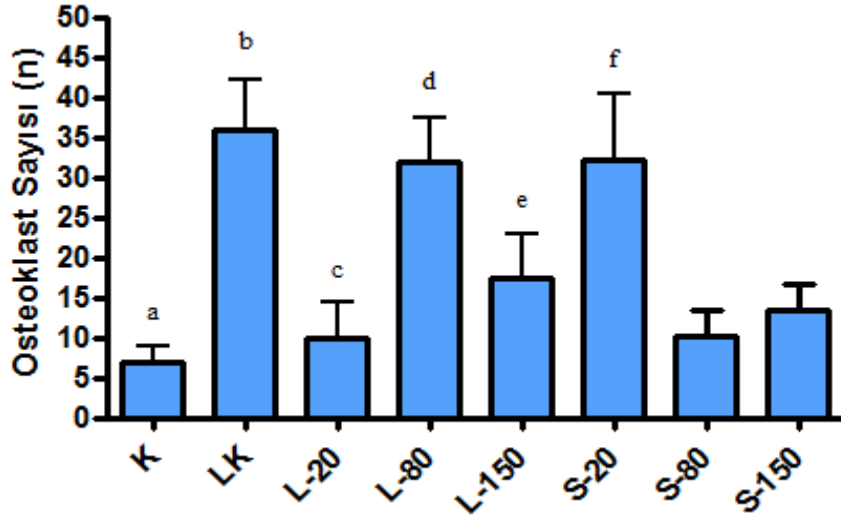
Diğer gruplar arasındaki farklılık önemli değildir ($p>0.05$).

L-20, S-80 ve S-150 gruplarında osteoklast sayısı K grubunda fazla bulunmasına rağmen sonuç istatistiksel olarak önemli bulunmadı.

Çizelge 7. Gruplara ait ortalama osteoklast sayısı.

Gruplar	Osteoklast Sayısı	
	$\bar{X} \pm S$	(Min – Maks) Ortanca
K	7.00 \pm 2.00 ^a	(5.00 – 10.00) 7.00
LK	35.88 \pm 6.22 ^b	(27.00 – 45.00) 35.50
L-20	10.00 \pm 4.50 ^c	(5.00 – 16.00) 10.00
L-80	31.88 \pm 5.51 ^d	(25.00 – 40.00) 32.00
L-150	17.50 \pm 5.37 ^e	(10.00 – 25.00) 15.50
S-20	32.25 \pm 8.19 ^f	(20.00 – 44.00) 32.00
S-80	10.13 \pm 3.22	(5.00 – 15.00) 10.00
S-150	13.50 \pm 3.29	(9.00 – 18.00) 14.00
Sonuç	KW=49.36	p=0.001* önemli

*p<0.05 önemli



Şekil 11. Gruplara ait ortalama osteoklast sayısı değerleri.

^ap<0.05 LK, L-80, L-150 ve S-20 gruplarından farklı; ^bp<0.05 L-20, L-150, S-80 ve S-150 gruplarından farklı; ^cp<0.05 L-80 ve S-20 gruplarından farklı; ^dp<0.05 L-150, S-80 ve S-150 gruplarından farklı; ^ep<0.05 S-20 grubundan farklı; ^fp<0.05 S-80 ve S-150 gruplarından farklı

4.3.3. Fibrozis

En düşük fibrozis oranı K grubunda gözlenirken, en yüksek fibrozis oranı L-80 grubunda elde edildi.

Gruplara ait fibrozis değerleri karşılaştırıldığında gruplar arasındaki farklılık önemli bulundu ($p<0.05$). (Çizelge-8) Gruplara ait değerler ikişerli karşılaştırıldığında;

K grubunda fibrozis değeri LK, L-80 ve S-20 gruplarına göre anlamlı derecede düşüktü ($p<0.05$).

LK grubunda fibrozis değeri L-20, L-150, S-80 ve S-150 gruplarından yüksek iken L-80 grubundan anlamlı oranda düşük idi ($p<0.05$).

L-20 grubunda fibrozis değeri L-80 ve S-20 gruplarına göre anlamlı oranda düşük bulundu ($p<0.05$).

L-80 grubunda fibrozis değeri L-150, S-20, S-80 ve S-150 gruplarına oranla daha yüksek bulundu ($p<0.05$).

L-150 grubunda fibrozis değeri S-20 grubuna göre anlamlı şekilde daha düşük bulundu ($p<0.05$).

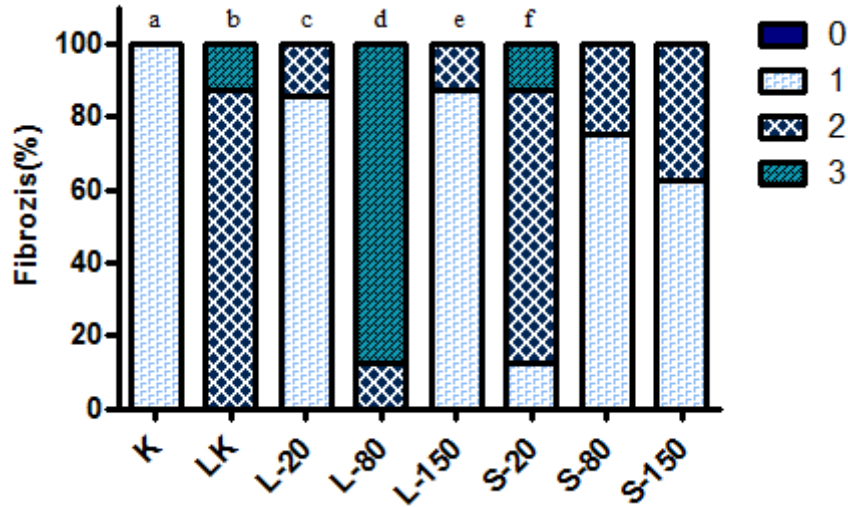
S-20 grubu ile S-80 grubu arasındaki farklılık önemli bulundu ($p<0.05$).

Diğer gruplar arasındaki farklılık önemli değildir ($p>0.05$).

Çizelge 8. Gruplara ait ortalama fibrozis değerleri.

Gruplar	Fibrozis	
	$\bar{X} \pm S$	(Min – Maks) Ortanca
K	1.00±0.00 ^a	(1.00 – 1.00) 1.00
LK	2.13±0.35 ^b	(2.00 – 3.00) 2.00
L-20	1.14± 0.37 ^c	(1.00 – 2.00) 1.00
L-80	2.88 ± 0.35 ^d	(2.00 – 3.00) 3.00
L-150	1.13±0.35 ^e	(1.00 – 2.00) 1.00
S-20	2.00± 0.53 ^f	(1.00 – 3.00) 2.00
S-80	1.25±0.46	(1.00 – 2.00) 1.00
S-150	1.38 ± 0.51	(1.00 – 2.00) 1.00
Sonuç	KW=41.80 p=0.001* önemli	

*p<0.05 önemli



Şekil 12. Gruplara ait ortalama fibrozis değerleri (%).

^ap<0.05 LK, L-80 ve S-20 gruplarından farklı; ^bp<0.05 L-20, L-80, L-150, S-80 ve S-150 gruplarından farklı; ^cp<0.05 L-80 ve S-20 gruplarından farklı; ^dp<0.05 L-150, S-20, S-80 ve S-150 gruplarından farklı; ^ep<0.05 S-20 grubundan farklı; ^fp<0.05 S-80 grubundan farklı

4.3.4. Enflamatuvar Hücre İnfiltratı

K grubunda enflamatuvar hücre infiltratı gözlenmezken, LK, L-80 ve S-20 gruplarında en yüksek düzeyde tespit edildi.

Gruplara ait enflamatuvar hücre infiltratı değerleri karşılaştırıldığında gruplar arasındaki farklılık önemli bulundu ($p<0.05$). (Çizelge-9) Gruplara ait değerler ikişerli karşılaştırıldığında;

K grubunda enflamatuvar hücre infiltratı miktarı LK, L-80, L-150, S-20 ve S-150 gruplarına göre anlamlı oranda düşük bulundu ($p<0.05$).

LK grubunda enflamatuvar hücre infiltratı miktarı L-20, L-150, S-80 ve S-150 gruplarına göre önemli oranda yüksek tespit edildi ($p<0.05$).

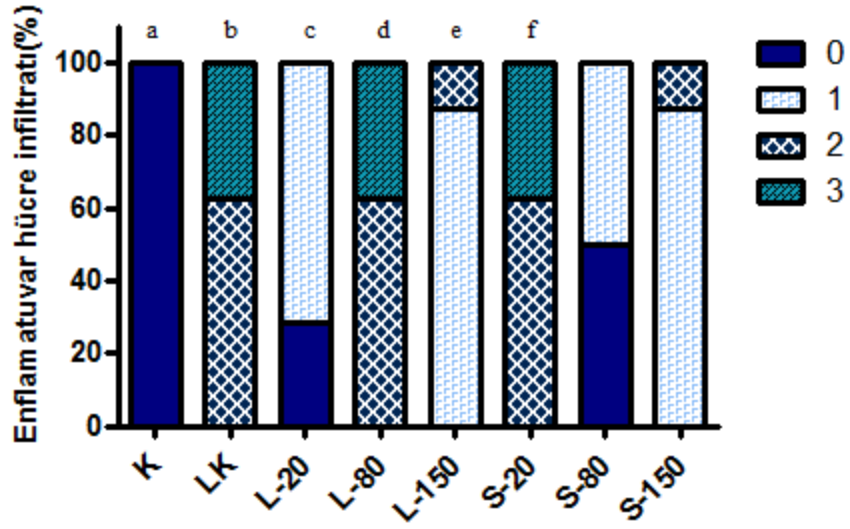
L-80 ve S-20 gruplarında enflamatuvar hücre infiltratı miktarı L-20, L-150, S-80 ve S-150 gruplarına göre anlamlı oranda yüksek bulundu ($p<0.05$).

Diğer gruplar arasındaki farklılık önemli değildi ($p>0.05$).

Çizelge 9. Gruplara ait enflamatuvar hücre infiltratı değerleri.

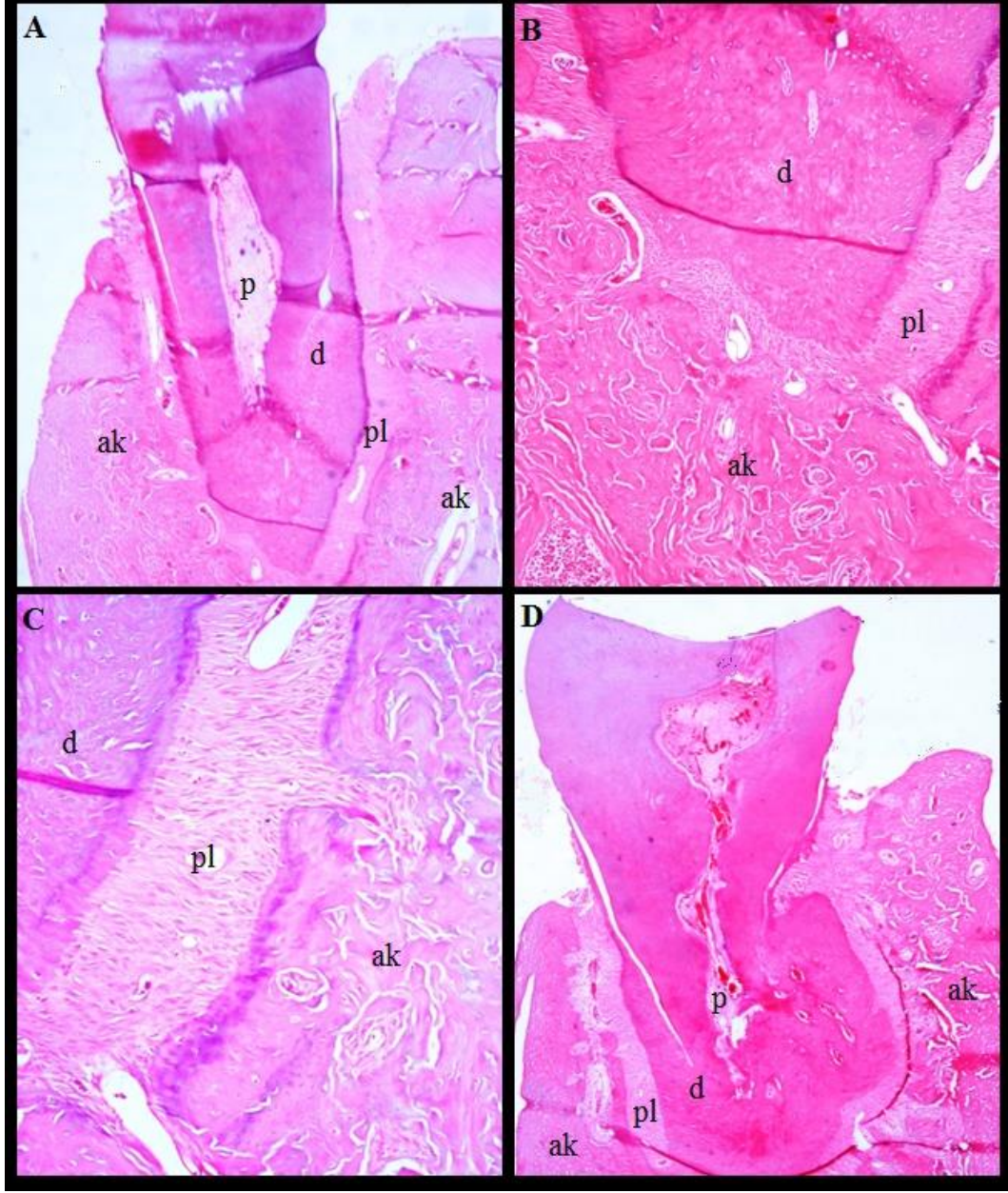
Gruplar	Enflamatuvar Hücre İnfiltratı	
	$\bar{X} \pm S$	(Min – Maks) Ortanca
K	0.00 ± 0.00 ^a	(0.00 – 0.00) 0.00
LK	2.38± 0.51 ^b	(2.00 – 3.00) 2.00
L-20	0.71± 0.48 ^c	(0.00 – 1.00) 1.00
L-80	2.38 ± 0.51 ^d	(2.00 – 3.00) 2.00
L-150	1.13 ± 0.35 ^e	(1.00 – 2.00) 1.00
S-20	2.38± 0.51 ^f	(2.00 – 3.00) 2.00
S-80	0.50± 0.53	(0.00 – 1.00) 0.50
S-150	1.13 ± 0.35	(1.00 – 2.00) 1.00
Sonuç	KW=50.62	p=0.001* önemli

* $p<0.05$ önemli



Şekil 13. Gruplara ait enflamatuvar hücre infiltratı dağılımı (%).

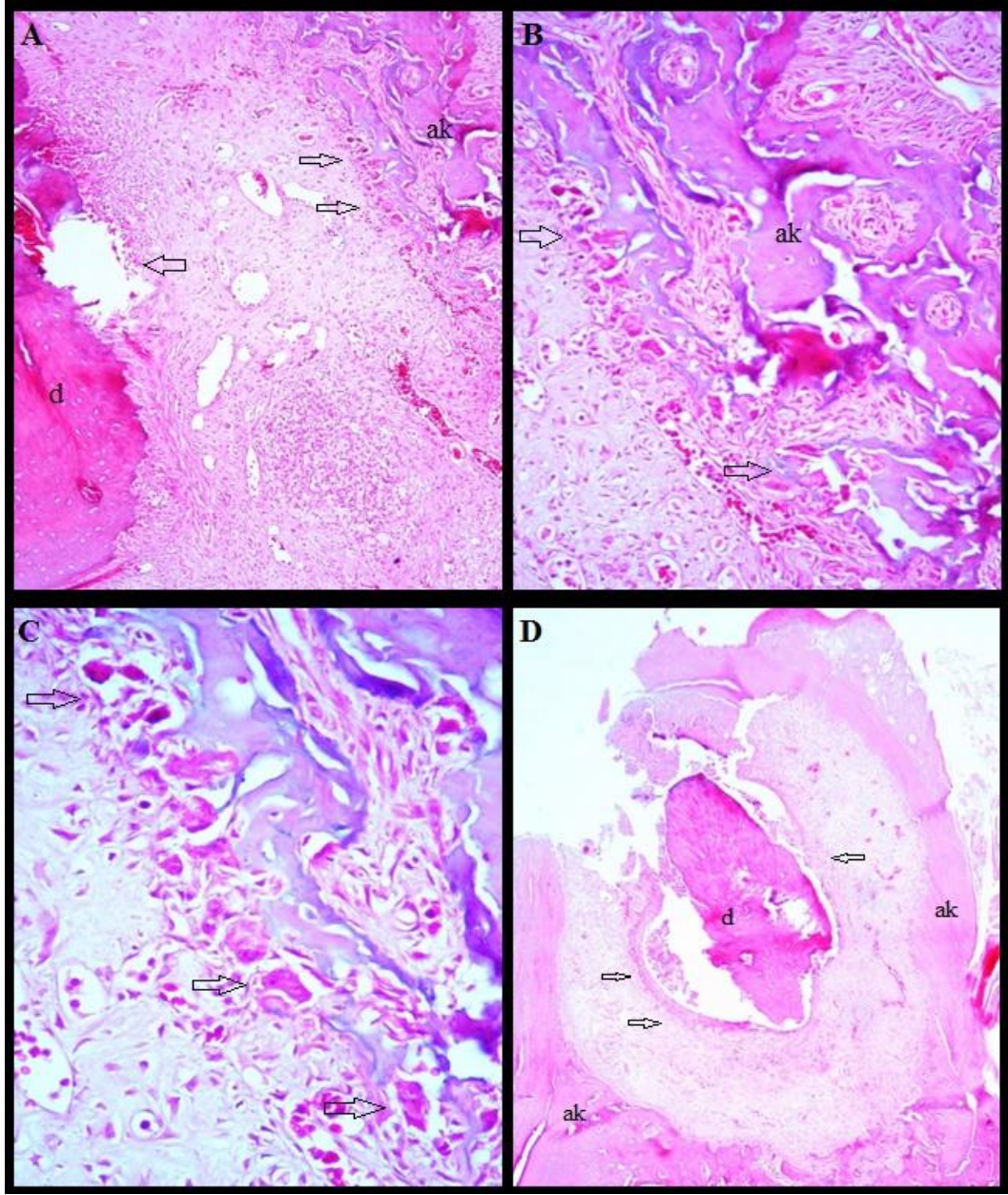
^a $p < 0.05$ LK, L-80, L-150, S-20 ve S-150 gruplarından farklı; ^b $p < 0.05$ L-20, L-150, S-80 ve S-150 gruplarından farklı; ^c $p < 0.05$ L-80 ve S-20 gruplarından farklı; ^d $p < 0.05$ L-150, S-80 ve S-150 gruplarından farklı; ^e $p < 0.05$ S-20 grubundan farklı; ^f $p < 0.05$ S-80 ve S-150 gruplarından farklı.



Şekil 14. Kontrol Grubu'na ait histolojik kesitler.

- A. Alveoler kemik ve diş fotoğrafı. Osteoblastik aktivite ve iltihabi hücre infiltratı görülmemektedir. Oldukça az sayıda osteoklast ve çok düşük oranda fibrozis izlenmektedir. (x40)
- B. Dişin apeksi ve alveoler kemik fotoğrafı. (x100)
- C. Dentin, periodontal ligament ve alveoler kemik (periodonsiyum) fotoğrafı. Normal yapı izlenmektedir. (x200)
- D. Osteoblastik aktivite ve iltihabi hücre infiltratı izlenmemektedir. Osteoklast miktarı minimaldir. Fibrozis oranı oldukça düşüktür. (x40)

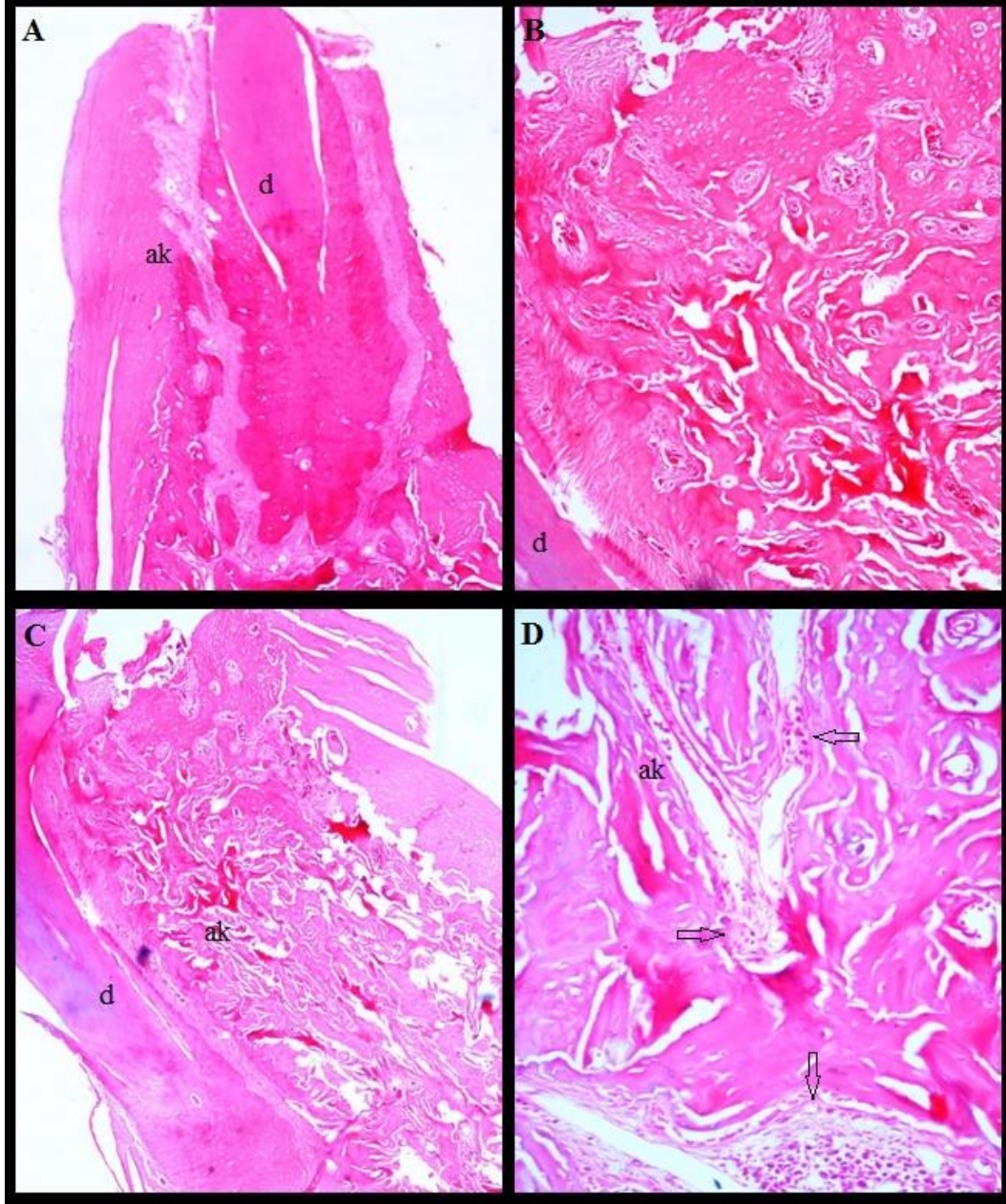
ak: Alveoler kemik, d: Dentin, p: Pulpa, pl: Periodontal ligament



Şekil 15. *Ligatürlü Kontrol Grubu'na ait histolojik kesitler.*

- A.** Diş köküne komşu alveoler kemikte ve dentinde yıkım görülmektedir. Yoğun bir şekilde iltihabi hücre infiltratı ve fibrozis izlenmektedir. Osteoblastik aktivite miktarı oldukça düşüktür. Sağ okla alveoler kemik boyunca dizilmiş olan osteoklastlar gösterilmektedir. Sol okla ise abseleşme tarzında yıkım gösterilmektedir. (x100)
- B.** Alveoler kemik boyunca dizilmiş olan osteoklastlar izlenmektedir. (x200)
- C.** Osteoklastların görüntüsü. (x400)
- D.** Kök kalıntısını kuşatan yoğun iltihap görülmektedir. Diş kökü çevresinde neredeyse kemik dokusu kalmamıştır. (x40)

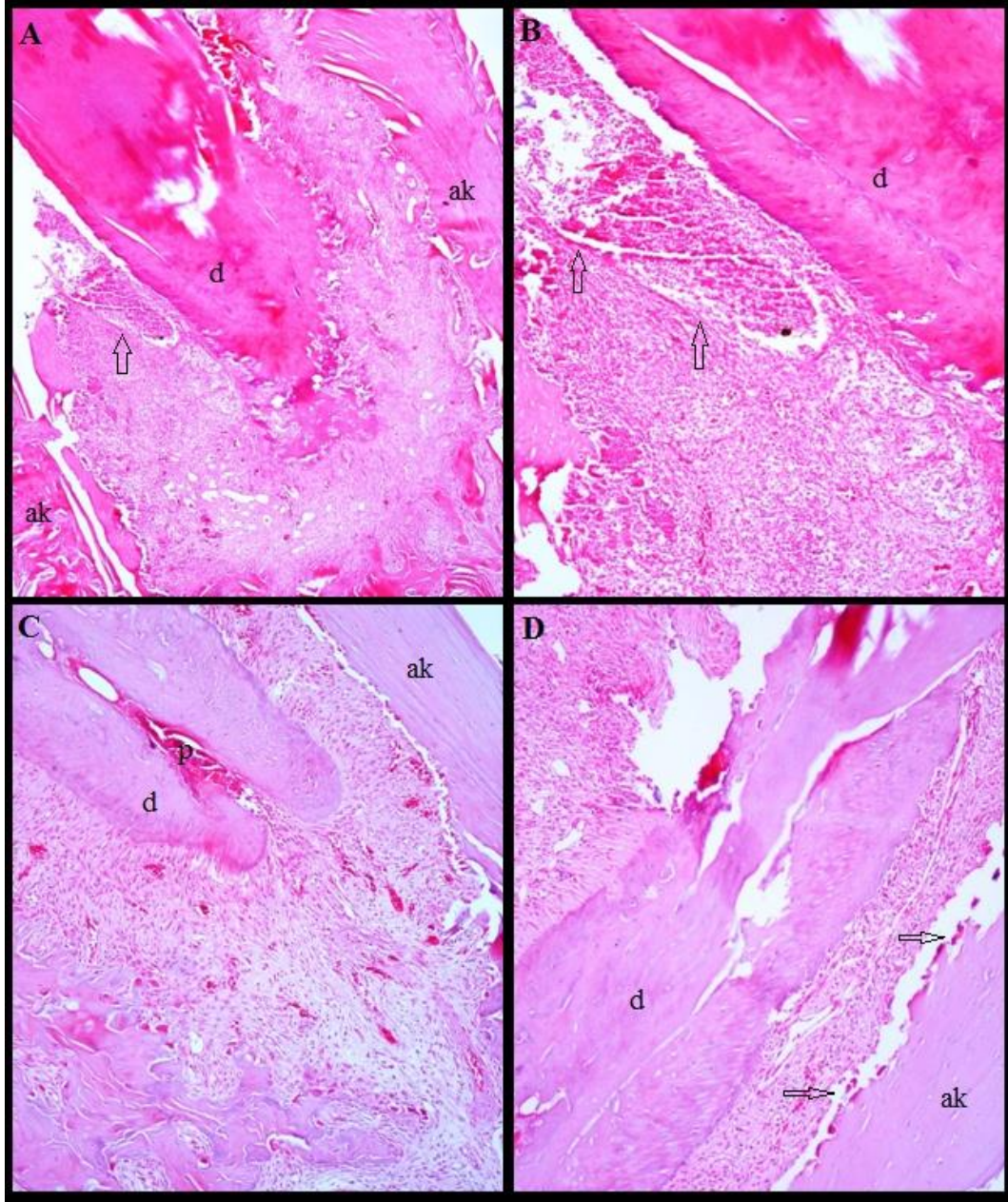
ak: Alveoler kemik, d: Dentin



Şekil 16. Lokal-20 mg/kg Grubu'na ait histolojik kesitler.

- A.** İltihabi hücre infiltratı yoktur ve fibrozis oranı düşüktür. (x40)
- B.** İltihabi hücre ve osteoklast gözlenmemektedir. Fibrozis oranı oldukça düşüktür. (x100)
- C.** Fotoğrafta yeni kemik yapım alanları görülmektedir. İltihabi hücreler ve osteoklastlar gözlenmemektedir. Fibrozis alanları yok denebilecek kadar azdır. (x40)
- D.** Alveoler kemikte osteoblastik aktivite izlenmektedir. (x200)

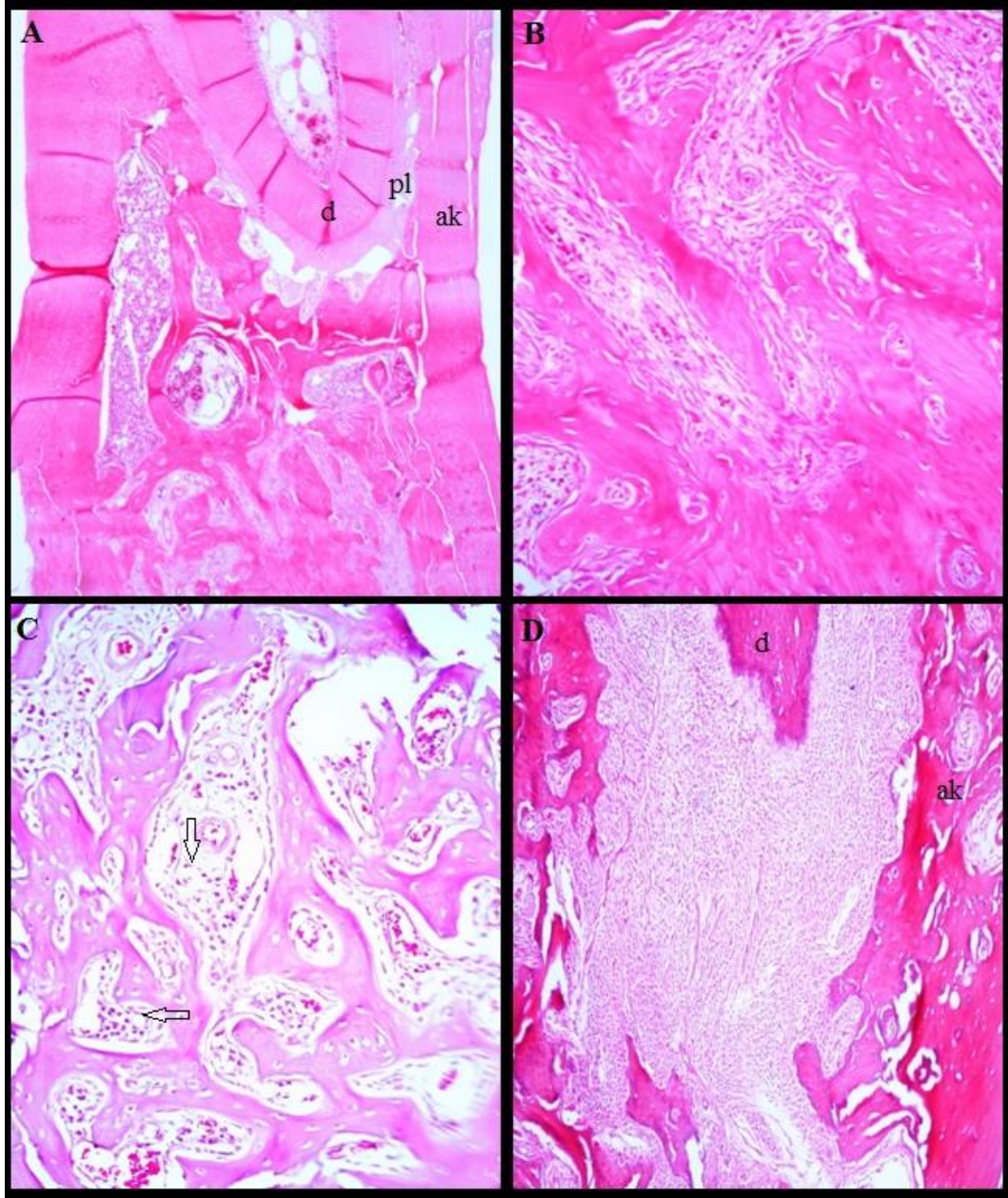
ak: Alveoler kemik, d: Dentin



Şekil 17. Lokal-80 mg/kg Grubu'na ait histolojik kesitler.

- A.** Diş kökünü çevreleyen yoğun osteoklastlar ve yoğun fibrozis alanları izlenmektedir. Osteoblastik aktivite oldukça düşüktür. Ok ile gösterilen alanda abse formasyonu mevcuttur. (x40)
- B.** Ok ile gösterilen alanda abse formasyonu görülmektedir. Ayrıca yoğun iltihabi hücre infiltratı izlenmektedir. (x100)
- C.** Dişin apikal bölgesinde görülen yoğun fibrozis. (x100)
- D.** Diş çevresinde sıralanmış osteoklastlar ve iltihabi hücreler görülmektedir. (x100)

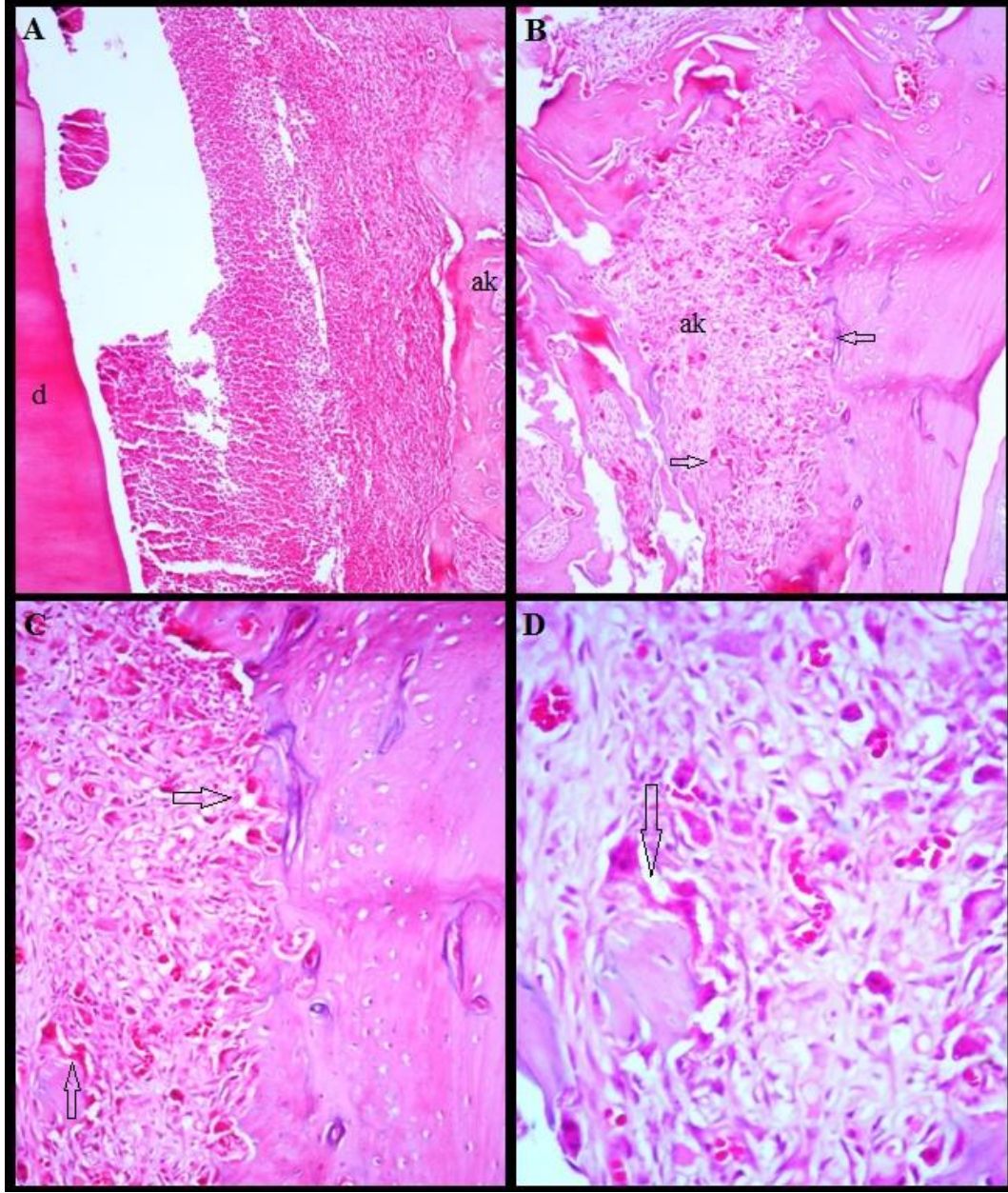
ak: Alveoler kemik, d: Dentin, p: Pulpa



Şekil 18. Lokal-150 mg/kg Grubu'na ait histolojik kesitler.

- A.** Düşük oranda fibrozis ve iltihabi hücre infiltratı gözlenmektedir. Alveoler kemikte osteoblastik aktivite izlenmektedir. (x40)
- B.** Yoğun osteoblastik aktivite. (x200)
- C.** Alveoler kemikte yeni kemik yapımı. Ok ile gösterilen bölgelerde kübik formlu osteoblastlar görülmektedir. (x200)
- D.** Alveoler kemik ve fibrozis alanları izlenmektedir. (x100)

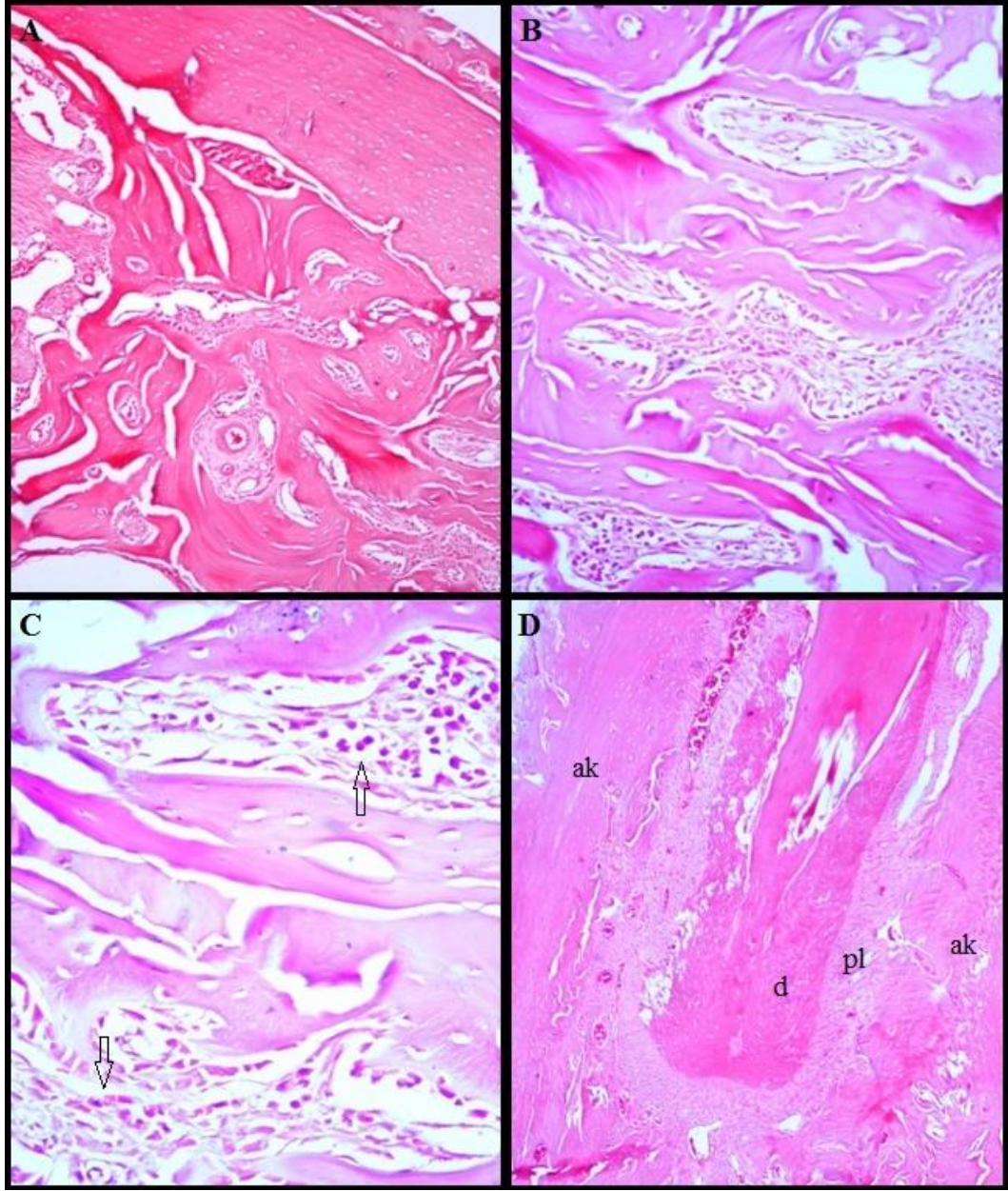
ak: Alveoler kemik, d: Dentin, p: Pulpa



Şekil 19. Sistemik-20 mg/kg Grubu'na ait histolojik kesitler.

- A.** Diş kökü ve alveoler kemik arasında yoğun iltihap. (x100)
- B.** Alveoler kemikte yoğun osteoklast görüntüsü. (x100)
- C.** Alveoler kemikte sıralanmış osteoklastlar görülmektedir. (x200)
- D.** Kemiyi yıkıma uğratan aktif osteoklastların görüntüsü. (x400)

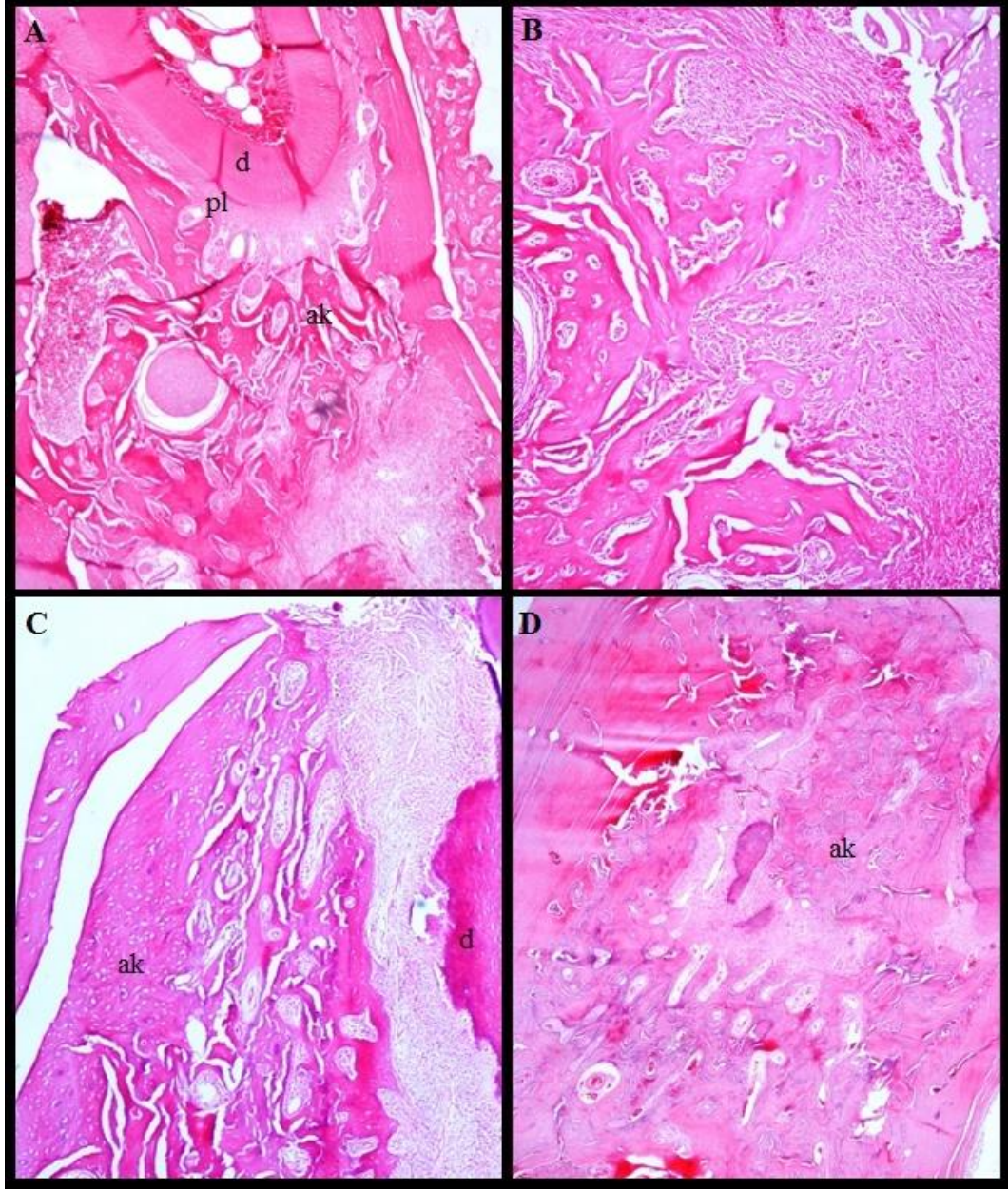
ak: Alveoler kemik, d: Dentin



Şekil 20. Sistemik-80 mg/kg Grubu'na ait histolojik kesitler.

- A.** Tüm yüzeylerde osteoblastik aktivite vardır. Fibrozis oranı oldukça düşüktür. Osteoklastlar gözlenmemektedir. (x100)
- B.** Tüm yüzeylerde kuvvetli osteoblastik aktivite ve düşük oranda fibrozis görülmektedir. (x200)
- C.** Büyük osteoblastlar, osteoblastik aktivite. (x400)
- D.** İltihabi hücre infiltratı bulunmamaktadır. Minimal sayıda osteoklast bulunmaktadır. (x40)

ak: Alveoler kemik, d: Dentin



Şekil 21. Sistemik-150 mg/kg Grubu'na ait histolojik kesitler.

- A.** Alveoler kemik içi ve dışında yeni kemik yapım alanları görülmektedir. (x40)
- B.** Yoğun osteoblastik aktivite. (x100)
- C.** Düşük oranda fibrozis ve iltihabi hücre infiltratı izlenmektedir. (x40)
- D.** Tüm sahayı dolduran kemik yapımı vardır. Yoğun osteoblastik aktivite izlenmektedir. (x40)

ak: Alveoler kemik, d: Dentin

5. TARTIŞMA

Periodontal hastalıklar MDP mikroorganizmaları ve konak savunma mekanizmaları arasındaki ilişkiden kaynaklanır [197]. MDP içerisindeki periodontopatojen bakterilere ve ürünlerine karşı farklı konak hücrelerinden birçok pro-enflamatuvar sitokin (IL-1, TNF- α , IL-6 vs.) salınır. Bu pro-enflamatuvar sitokinler periodonsiyumda enflamatuvar yanıtı başlatmakla ve sürdürmekle görevlidir [13]. IL-1 bu sitokinlerin en önemlilerinden biridir ve kemik rezorpsiyonunu organize eder. Pro-enflamatuvar etkilerini monosit ve fibroblastlardan PGE₂ salınımını ve ECM'i yıkıma uğratan MMP'lerin salınımını stimüle ederek gösterirler [16]. Periodontal hastalığın düzenlenmesinde rol oynayan bir diğer sitokin IL-10'dur. IL-10'unbirçok deneysel modelde çeşitli hücre tipleri için anti-enflamatuvar ve immünoşüpresif etkisi olduğu gösterilmiştir [20, 21]. Periodontal lezyonlarda anti-enflamatuvar ve pro-enflamatuvar sitokinler arasındaki denge ya da dengesizlik hastalığın seyrini belirler [138, 139, 198]. Bu nedenle periodontal hastalıklarda pro-enflamatuvar ve anti-enflamatuvar sitokin düzeylerinin belirlenmesi hastalığın seyri açısından önemlidir. Periodontitiste ECM ve alveoler kemik yıkımına çoğunlukla konak kaynaklı enzimler, sitokinler ve diğer mediatörler neden olur. Bundan dolayı çalışmalar bazı yıkıcı konak mekanizmalarını değiştirerek periodontal doku yıkımını önleme üzerine yoğunlaşmıştır [145].

Hüyük asitler doğada bulunan en yaygın organik karbon formları olup [38], lökositlerin aktive ettiği IL-1 β ve TNF- α salınımını inhibe ederek güçlü anti-enflamatuvar etki gösterirler [199]. Bu çalışmada ratlarda ligatürle oluşturulan deneysel periodontitis modelinde sistemik ve lokal uygulanan hüyük asidin alveoler kemik kaybı ve gingival enflamasyon üzerine etkileri histopatolojik, morfometrik ve biyokimyasal açıdan araştırılmış ve periodontal hastalık oluşumu ile aynı zamanda hüyük asit uygulamasının periodontal hastalığı önlemedeki etkisi değerlendirilmiştir.

Ratların molar dişleri etrafına ligatür yerleştirilmesiyle oluşturulan deneysel periodontitis modelleri yaygın olarak kullanılmaktadır [200-202]. Diş çevresine yerleştirilen ligatür MDP için retansiyonu arttırıcı bir faktör olarak işlev görerek doku bütünlüğünü bozar ve sonuçta periodontitis oluşumuna yol açar. Alveoler kemik yıkımı miktarı ilk on beş günde hızlıdır ve daha sonra azalarak devam eder. Alveoler kemik kaybının ligatür bağlandıktan kısa bir süre sonra oluştuğunu gösteren çalışmalar mevcuttur

[200-203]. Kuhr ve ark. [203] ratların molar dişlerine suture geçirmişler ve 1, 15, 30. ve 60. günlerde aldıkları kesitlerde morfolometrik olarak alveoler kemik düzeyini ölçmüşlerdir. Çalışmanın sonucunda en fazla kemik kaybının ilk 15 günlük süreçte olduğu, 30. ve 60. günlerdeki kaybın hafif bir artış olarak devam ettiğini belirlemişlerdir. Bununla beraber ratlarda dişlerin oklüzal-bukkal-distal yönde hareketi ligatürün etkisinde zamanla azalmaya neden olabilir. Ligatürle oluşturulan deneysel periodontitis modelinde bir süre sonra gözlenen yıkım şiddetindeki azalma bu durum ile açıklanabilir. Bundan dolayı ligatürle oluşturulan deneysel periodontitis modellerinde çalışma süresi ≤ 15 gün olmalıdır [202, 203]. Buna karşın dokudaki travma ve bakteri miktarındaki artışa bağlı olarak periodontal yıkım insanlardaki kronik periodontitis seyrinden farklı olarak akut bir seyir gösterir. Bu da ratlarda oluşturulan deneysel periodontitis modelinin kısıtlamalarından biri olarak söylenebilir. Bu çalışmada deneysel periodontitisi indüklemek amacıyla bütün ratların birinci molar dişleri çevresine 15 gün süresince submarjinal olarak ligatür yerleştirildi ve 15. günde histopatolojik ve morfolometrik değerlendirme için ratlar sakrifiye edildi. Bu sürede ligatür yerleştirilen bütün gruplarda deneysel periodontitis başarıyla oluşturuldu.

Ratlarda molar dişler oklüzal yüzeylerdeki atrizyona bağlı olarak sürekli erüpsiyona uğrar. Bu nedenle alveoler kemik kendi kendini sürekli şekillendirir [204]. Periodontal hastalığın görülmediği durumlarda bukkal yüzeylerde mine-sement sınırı ve alveoler kemik kreti arasındaki mesafe sabit kalırken, palatal ve lingual alanlarda bu iki nokta arasındaki mesafe yaşa bağlı olarak artış gösterir [205]. Bu nedenle çalışmalarda aynı haftalık ratlar kullanılmaktadır. Biz de çalışmamızda standart olarak 12 haftalık erkek Wistar ratlar kullandık.

Çalışmamızda alveoler kemik kaybı miktarını ölçmek için stereomikroskop yardımıyla mine-sement sınırı ile alveoler kret tepesi arasındaki mesafenin ölçümü tercih edildi. Deneysel olarak oluşturulan alveoler kemik kaybı iki yöntemle belirlenebilir. Birincisi mine-sement sınırı ile alveoler kret tepesi arasındaki mesafenin ölçümü, ikincisi açığa çıkan kök yüzeylerinden alan ölçümüdür. Alan ölçümü mesafe ölçümüne oranla kemik kaybını daha erken dönemlerde belirleyebilir ancak 15. günde her iki yöntem de kemik kaybı açısından doğru sonuçlar verir. Daha ileri günlerde ratlarda ligatür ile oluşturulan periodontal kaybı belirlemede alan ölçümü yetersiz kalırken mesafe ölçümü

daha güvenilir sonuçlar verebilir [203]. Bu nedenle mine sement sınırı ile alveoler kret tepesi arasındaki mesafenin ölçümü daha güvenilir bir yöntem olarak söylenebilir [202, 206].

Diş ligatür yerleştirilmesiyle alveoler kemikte hızlı bir yıkım meydana gelmektedir [28, 200, 207]. Çalışmamızda LK grubundaki alveoler kemik kaybı miktarı en yüksek bulundu. Sistemik ve lokal hümitik asit grupları alveoler kemik kaybını farklı oranlarda azaltmakla birlikte, L-20, L-150, S-80 ve S-150 gruplarındaki alveoler kemik kaybı miktarı LK grubundan anlamlı oranda düşük bulundu. Özellikle S-80 ve S-150 gruplarındaki alveoler kemik kaybı miktarının K grubuna yakın olması dikkat çekicidir. Bu durum histopatolojik değerlendirmede gözlenen yüksek osteoblastik aktivite, düşük osteoklast sayısı, düşük oranda enflamatuvar hücre infiltratı ve yeni kemik yapım alanlarının varlığı ile açıklanabilir.

Ratlarda ligatürle oluşturulan deneysel periodontitis modeli dokuları lokal olarak etkileyen bir modeldir. Bu nedenle lokal sitokin seviyelerinin belirlenmesi sistemik seviyelere oranla lokal enflamasyon durumunun tespit edilebilmesi açısından daha güvenilir sonuçlar sağlayabilir. Ratlarda ligatür yerleştirilen dişlerin dişeti dokusundan alınan biyopsi örneklerinden homojenat oluşturulması lokal sitokin seviyelerinin belirlenebilmesi için uygun bir yöntemdir [208].

Yüksek IL-1 β düzeyi dişeti dokularında enflamasyon derecesinin bir indikatörüdür [209]. Ayrıca IL-1 β seviyeleri periodontal hastalıklar ile ilişkili olup kemik yıkımının potansiyel bir stimülatörü olarak ileri periodontal yıkımın patogeneğinde rol oynar [75, 114, 210]. Çalışmamızda L-20, L-150, S-20, S-80 ve S-150 gruplarında dişeti homojenatı IL-1 β düzeyinin LK grubuna göre anlamlı şekilde azaldığı tespit edildi. Özellikle S-80 grubundaki dişeti homojenatı IL-1 β değeri K grubuna yakın bulundu.

Hönig ve ark. [18] periodontitis hastalarının dişeti dokularında farklı miktarlarda IL-1 β seviyesi tespit etmişlerdir. Fakat sağlıklı dişeti dokularında IL-1 β düzeyi tespit edememişlerdir. Çalışmamızda da benzer olarak ligatürle oluşturulan deneysel periodontitis gruplarının dişeti dokularında kontrol grubundan daha yüksek oranda IL-1 β düzeyi tespit edildi. Kontrol grubunda ise IL-1 β düzeyi oldukça düşüktü.

IL-10, IL-1 ve TNF- α gibi pro-enflamatuvar sitokinlerin sentezini inhibe ederek anti-enflamatuvar etki göstermektedir [125]. IL-10 enflamasyonla ilişkili PGE₂ ve kemokinlerin üretimini inhibe eder. Ayrıca IL-1ra ve çözünebilir TNF- α reseptörleri gibi anti-enflamatuvar mediatör üretimini artırır [144]. Periodontitis lezyonlarında IL-10 üretimi sağlıklı dişeti dokularına göre daha düşüktür [211]. Çalışmamızda dişeti homojenatı IL-10 düzeyi çalışma gruplarında LK grubuna göre daha yüksek oranda tespit edildi. En yüksek değer S-80 grubunda elde edildi ve bu değer diğer tüm gruplardan anlamlı şekilde yüksek bulundu. Sonuçlar sistemik olarak alınan 80 mg/kg hümik asit miktarının dişetinde lokal olarak hem pro-enflamatuvar sitokin (IL-1 β) düzeyini anlamlı şekilde azalttığını hem de anti-enflamatuvar sitokin (IL-10) düzeyini anlamlı şekilde arttırdığını göstermiştir.

Pro-enflamatuvar ve anti-enflamatuvar sitokinlerin serum düzeylerinin belirlenmesi hem konak korumasındaki rollerinin çalışılmasına yardımcı olur hem de periodontitis hastalarının sistemik enflamatuvar durumlarının belirlenmesinde önemli rol oynar. Çalışmalar kronik periodontitisin düşük düzey sistemik enflamasyonla ilişkili olduğunu göstermektedir [212-214].

Çalışmamızla benzer olarak, Passoja ve ark. [144] serum IL-10 düzeyinin periodontitis hastalarında sağlıklı kontrollere göre daha düşük olduğunu bildirmişlerdir. Fakat hastalığın ileri aşamalarında serum IL-10 düzeyinin tekrar yükseldiğini göstermişler. Çalışmamızdan farklı olarak, serum IL-10 düzeyinin kronik periodontitisli hastalarda sağlıklı kontrollere oranla daha yüksek olduğunu bildiren çalışmalar da mevcuttur [130, 215, 216]. Çalışmamızda serum IL-10 seviyelerine bakıldığında en yüksek değer S-80 grubunda elde edildi. S-80 grubundaki serum IL-10 düzeyi diğer tüm gruplardan önemli oranda yüksek bulundu.

Gorska ve ark. [216] periodontitisli bireylerde serum IL-1 β konsantrasyonunun sağlıklı kontrollere göre daha yüksek düzeyde olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda serum IL-1 β düzeyi en yüksek LK grubunda, en düşük K grubunda tespit edildi. L-20, L-150, S-20, S-80 ve S-150 gruplarında serum IL-1 β düzeyi LK grubuna göre düşük bulundu. Özellikle S-80 ve S-150 gruplarındaki IL-1 β düzeyi diğer çalışma gruplarına göre daha düşük bulundu. S-80 grubunda serumdan elde edilen sonuçlar hümik asidin bu dozda anti-

enflamatuvar sitokin (IL-10) düzeyini arttırdığını, pro-enflamatuvar sitokin (IL-1 β) düzeyini azalttığını göstermektedir.

Periodontitisin histopatolojisinde mononükleer hücrelerden oluşan enflamatuvar infiltratlar ve yüksek sayıdaki osteoklastlar önemli rol alırlar [217]. Bakteriyel uyarı ile konak yanıt uyarılarak enflamatuvar hücre infiltratında ve osteoklast formasyonunda artış meydana gelir. Böylece alveoler kemikte kayıp olur [206]. IL-1 β gibi enflamatuvar sitokinler bölgeye enflamatuvar hücre göçünü yönlendirir [218]. Kemik kaybı miktarı osteoklast sayısı ve osteoblastik kemik formasyonu arasındaki dengeye bağlıdır [219]. Osteoblastlar ve osteoblastik aktivite kemik matriks komponentlerinin üretimi ve osteoklast aktivitesinin kontrolü için önemlidir [220]. Bu nedenle periodontal hastalığın histopatolojisini değerlendirmede bu parametreler yarar sağlar. Yapılan çalışmalarda alveoler kemik kaybı miktarı ile osteoklast sayısı, fibrozis alanları ve enflamatuvar hücre infiltratı arasında bir korelasyon, osteoblastik aktivite ile arasında ise ters bir korelasyon olduğu gösterilmiştir [200, 207, 221].

Toker ve ark. [200] yaptıkları bir deneysel periodontitis modeli çalışmasında N-asetilsisteinin alveoler kemik kaybını azalttığını bulmuşlardır. Bu çalışmada alveoler kemik kaybının azalması osteoklastik aktivitenin azalması kadar ve osteoblastik aktivitenin artmasına da bağlı olduğu ileri sürülmektedir. Yine, Toker ve ark. [207] propolisin deneysel periodontitis modelinde alveoler kemik kaybı üzerine morfometrik ve histopatolojik etkilerini değerlendirdikleri bir diğer çalışmada, propolisin alveoler kemik kaybını azalttığı fakat enflamatuvar hücre infiltratı üzerine etkisinin olmadığını bulmuşlardır. Aynı çalışmada propolisin osteoklast sayısını azalttığı ve osteoblastik aktiviteyi arttırdığı sonucu elde edilmiştir. Çalışmamız bu çalışmalarla uyumlu olarak, alveoler kemik kaybının düşük osteoklast sayısı ve yüksek osteoblastik aktiviteyle ilişkili olduğunu gösterdi. Enflamatuvar hücre infiltratı L-20, L-150, S-80 ve S-150 gruplarında LK grubuna göre daha düşük düzeyde tespit edildi.

Nyman ve ark. [222] yaptıkları bir deneysel periodontitis modeli çalışmasında, alveoler kemik kaybındaki azalmanın osteoklast sayısında azalmayla ilişkili olduğunu öne sürmektedir. Bu çalışmayla benzer olarak çalışmamızda, osteoklast sayısı ve alveoler kemik yıkımı arasında bir ilişki bulundu.

Hou ve ark. [223] periodontitisli bölgelerden elde ettikleri dişeti biyopsilerinde sağlıklı bölgelere göre IL-1 β konsantrasyonunun arttığını bulmuşlardır. Bu artış enflamatuvar hücre yoğunluğuyla ilişkilendirilmiştir. Çalışmamızda da dişeti homojenati IL-1 β düzeyi ile enflamatuvar hücre infiltratı arasında bir korelasyon bulundu.

Çalışmamızda alveoler kemik yıkımının yüksek olduğu LK, L-80 ve S-20 gruplarında osteoklast sayısı, enflamatuvar hücre infiltratı oranı ve fibrozis alanları yüksek bulunurken osteoblastik aktivite düşük bulundu. Alveoler kemik yıkımını miktarının düşük bulunduğu S-80 ve S-150 gruplarında osteoblastik aktivite yüksek bulunurken, fibrozis alanları, enflamatuvar hücre infiltratı oranı ve osteoklast sayıları düşük olarak tespit edildi.

Hümik asitlerin başlıca terapötik özellikleri anti-bakteriyel, antitoksik, anti-ülserojenik, antiartritlik, antialerjik, immünomodülatör ve anti-enflamatuvar olarak sayılabilir [37, 187, 224].

Van Rensburg ve ark. [196] ratlar üzerine yaptıkları bir çalışmada, potasyum humatın anti-enflamatuvar özelliğini tespit etmişler ve çalışmanın sonucunda linyitten elde edilen hümik asit solüsyonunun (61 mg/kg) ratların kulaklarında oluşturulan ödemi baskılamada anti-enflamatuvar etki gösterdiği bilinen prednizolon (steroid grubu) kadar etkili olduğunu bulmuşlardır. Çalışmamızda da benzer olarak 80 mg/kg hümik asit solüsyonunun sistemik olarak verilmesi dişeti enflamasyonunun bir göstergesi olan IL-1 β düzeyini anlamlı oranda azalttığı bulundu.

Yapılan bir çalışmada, potasyum humatın lenfosit proliferasyonu, sitokin üretimi ve kompleman aktivasyonu üzerindeki etkisi araştırılmış. İn vitro çalışmanın sonucunda, potasyum humatın 40 μ g/ml dozunda mononükleer lökositlerin stimüle ettiği TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve IL-10 salınımını önemli oranda inhibe ettiği bulunmuştur [199]. Ayrıca, potasyum humat 10 μ g/ml ve daha yüksek dozlarda (10-60 μ g/ml) hem alternatif hem de klasik kompleman yolu inhibe ederek anti-enflamatuvar etki gösterdiği saptanmıştır [199]. Bu çalışmayla paralel olarak çalışmamızda da hümik asit S-80 grubunda serum ve dişeti homojenati IL-1 β düzeyini önemli oranda azaltırken, farklı olarak IL-10 düzeyini arttırdığı tespit edildi.

Hümik asit anti-enflamatuvar özelliğini farklı mekanizmalarla göstermektedir. Bu mekanizmalardan bir kısmı aşağıdaki çalışmalarda açıklanmıştır.

Joone ve ark. [158] potasyum humatın, nötrofillerin aktive ettiği ve doku hasarına neden olabilecek sitokinlerin üretimiyle ilişkili olan mediatörlerin salınımını inhibe ettiğini göstermişlerdir. Ayrıca sonuçlar hümik asidin enflamasyon sürecinde önemli bir rol oynayan myeloperoksidaz salınımını da inhibe ettiğini göstermiştir. Hümik asidin anti-enflamatuvar özelliği nötrofil tutunmasının ve degranülasyonunun inhibisyonuna bağlı gerçekleştiği öne sürülmektedir.

Hümik asidin dermal, oral ya da subkutan kullanımı enflamasyon üzerinde inhibitör etkiye neden olduğu ve hümik asidin bu enflamasyonu inhibe edebilme kabiliyeti içerisindeki flavonoid gruplarıyla ilişkili olabileceğine inanılır [38].

Junek ve ark. [35] yaptıkları çalışmada hümik asidin konsantrasyona bağlı olarak çift taraflı etkisinin olduğunu göstermişlerdir. Düşük hümik asit konsantrasyonları (10-80 µg/ml) TNF-α salınımını 3 kat artırırken (pro-enflamatuvar etki), daha yüksek konsantrasyonları (>100 µg/ml) yaklaşık 10 kat azaltmıştır (anti-enflamatuvar etki). Çalışmanın bu sonucunu hümik asidin anti-enflamatuvar etkisinin lipoksijenaz yolunu inhibe etmesine bağlamışlardır.

Yapılan bir *in vitro* çalışmada potasyum humatın enflamasyonda anahtar rol oynayan adezyon moleküllerini doğrudan bloke ettiği ve bu nedenle anti-enflamatuvar etki gösterdiği sonucuna varılmıştır [158].

Ratlarda yapılan benzer bir çalışmada Naude ve ark. [34] hem normal hem de immün yetmezliği bulunan gruplarda potasyum humatın enflamatuvar reaksiyonları indometazin kadar inhibe edebildiğini göstermişlerdir.

Yapılan bir başka çalışmada hümik asidin güçlü bir hümoral immün stimülanı olduğu ve immün yanıtın hem miktarını hem de süresini uzattığı bulunmuştur [193]. Bu özellik hümik asidin konak savunma yanıtını arttırarak enfeksiyonla savaşta konağa yardımcı olduğunu göstermektedir.

Hümik asitlerin kemik dokusu üzerine etkilerini araştıran çalışmaların sayısı sınırlıdır [177, 178]. Yapılan bir deneysel kemik fraktürü çalışmasında fraktür sonrası ilk hafta boyunca hümik asit uygulanmıştır. Bu uygulamayla osteoid formasyonunda ve kemik mineralizasyonunda hızlanma elde edilmiştir. Fakat hümik asit tedavisi ikinci haftaya ertelendiği zaman osteoid formasyonu ve mineralizasyon önemli oranda düşüş tespit edilmiştir [177]. Yine çocuklardaki kemik fraktürleri üzerine yapılan bir diğer çalışmada hümik asidin kemik rejenerasyonu üzerine pozitif etki sağladığı gösterilmiştir [178]. Bu çalışmalarla uyumlu olarak çalışmamızda özellikle S-80 ve S-150 gruplarında alveoler kemik yıkımında azalma, osteoblastik aktivitede artma gözlemlendi. Ayrıca diş köküne komşu alveoler kemik içerisinde yeni kemik yapım alanları görüldü.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızın sonuçları aşağıda gösterildiği şekilde özetlenebilir:

- ❖ Deneysel periodontitis modeli başarıyla oluşturulmuştur.
- ❖ Morfometrik ölçüm sonuçlarına göre Lokal-20 mg/kg, Lokal-150 mg/kg, Sistemik-80 mg/kg ve Sistemik-150 mg/kg hümik asit uygulaması ratlarda ligatürle oluşturulan periodontal yıkımı azaltmıştır. Özellikle Sistemik-80 mg/kg ve Sistemik-150 mg/kg hümik asit dozlarının periodontal yıkım üzerine etkileri Kontrol grubu ile benzer bulunmuştur.
- ❖ ELISA sonuçlarına göre serum ve dişeti homojenatı IL-10 seviyeleri özellikle Sistemik-80 mg/kg hümik asit uygulaması yapılan grupta yüksek bulunmuştur.
- ❖ ELISA sonuçlarına göre Sistemik-80 mg/kg hümik asit uygulaması ratlardan elde edilen serum ve dişeti homojenatı IL-1 β seviyelerini azaltmıştır.
- ❖ Sistemik-80 mg/kg hümik asit uygulamasının histopatolojik olarak enflamatuvar hücre infiltrat oranını, fibrozis skorunu ve osteoklast sayılarını azaltıp, osteoblastik aktiviteyi arttırdığı gözlenmiştir.

Hayvan çalışma modellerinin limitasyonları göz önünde bulundurulduğunda bu çalışmanın histopatolojik ve morfometrik sonuçlarına göre sistemik olarak uygulanan 80 mg/kg hümik asidin ratlarda deneysel periodontitis modelindeki alveoler kemik kaybını azaltmada ve enflamasyonu baskılamada etkili olduğu öne sürülebilir.

Çalışmamızda hümik asidin doku yıkımını önlediği gösterilmiş olmasına karşın etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Çalışmamız Diş Hekimliği'nde yapılan ilk deneysel çalışma olup, hümik asidin alveoler kemik kaybı ve dişeti enflamasyonu üzerine etkisinin tam olarak hangi mekanizmalar veya yollar üzerinden gerçekleştiğinin araştırılması için ileri çalışmalara gereksinim vardır.

KAYNAKLAR

1. Novak, M.J. (2006). Classification of diseases and conditions affecting the periodontium. In: Carranza's Clinical Periodontology. Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri, **Tenth edition**, 100-109.
2. Greenstein, G. & Caton, J. (1990). Periodontal disease activity: a critical assessment, *J Periodontol*, **61**, 543-552.
3. Goodson, J. M. (1992). Diagnosis of periodontitis by physical measurement: interpretation from episodic disease hypothesis, *J Periodontol*, **63**, 373-382.
4. Carranza, F.A., Newman, M.G. (1996) *Glickman's Clinical Periodontology*, W B Saunders Co, **Eight Edition**.
5. Lindhe, J. (1998). *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*. **Third Edition**.
6. Garlet, G. P., Cardoso, C. R., Campanelli, A. P., Ferreira, B. R., Avila-Campos, M. J., Cunha, F. Q. & Silva, J. S. (2007). The dual role of p55 tumour necrosis factor-alpha receptor in Actinobacillus actinomycetemcomitans-induced experimental periodontitis: host protection and tissue destruction, *Clin Exp Immunol*, **147**, 128-138.
7. Darveau, R. P. (2000). *Oral innate host defence responses: interactions with microbial communities and their role in the development of the disease*, In: *Oral Bacterial Ecology: The Molecular Basis*, Horizon Scientific Press, Wymondham, UK, 170-202.
8. Cochran, D. L. (2008). Inflammation and bone loss in periodontal disease, *J Periodontol*, **79**, 1569-1576.
9. Kjeldsen, M., Holmstrup, P. & Bendtzen, K. (1993). Marginal periodontitis and cytokines: a review of the literature, *J Periodontol*, **64**, 1013-1022.
10. Eley, B. M. & Cox, S. W. (1998). Advances in periodontal diagnosis. 5. Potential inflammatory and immune markers, *Br Dent J*, **184**, 220-223.
11. Offenbacher, S. (1996). Periodontal diseases: pathogenesis, *Ann Periodontol / Am Acad Periodontol*, **1**, 821-878.
12. Birkedal-Hansen, H. (1993). Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction, *J Periodontal Res*, **28**, 500-510.
13. Page, R. C. (1991). The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease, *J Periodontal Res*, **26**, 230-242.
14. Assuma, R., Oates, T., Cochran, D., Amar, S. & Graves, D. T. (1998). IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis, *J Immunol*, **160**, 403-409.
15. Graves, D. T., Delima, A. J., Assuma, R., Amar, S., Oates, T. & 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**, 1419-1425.
16. Dewhirst, F. E., Stashenko, P. P., Mole, J. E. & Tsurumachi, T. (1985). Purification and partial sequence of human osteoclast-activating factor: identity with interleukin 1 beta, *J Immunol*, **135**, 2562-2568.
17. Matsuki, Y., Yamamoto, T. & Hara, K. (1991). Interleukin-1 mRNA-expressing macrophages in human chronically inflamed gingival tissues, *Am J pathol*, **138**, 1299-1305.
18. Honig, J., Rordorf-Adam, C., Siegmund, C., Wiedemann, W. & Erard, F. (1989). Increased interleukin-1 beta (IL-1 beta) concentration in gingival tissue from periodontitis patients, *J Periodontal Res*, **24**, 362-367.

19. Fiorentino, D. F., Bond, M. W. & Mosmann, T. R. (1989). Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones, *J Exp Med*, **170**, 2081-2095.
20. Arai, T., Hiromatsu, K., Kobayashi, N., Takano, M., Ishida, H., Nimura, Y. & Yoshikai, Y. (1995). IL-10 is involved in the protective effect of dibutyl cyclic adenosine monophosphate on endotoxin-induced inflammatory liver injury, *J Immunol*, **155**, 5743-5749.
21. Tumpey, T. M., Elnor, V. M., Chen, S. H., Oakes, J. E. & Lausch, R. N. (1994). Interleukin-10 treatment can suppress stromal keratitis induced by herpes simplex virus type 1, *J Immunol*, **153**, 2258-2265.
22. Salvi, G. E., Lawrence, H. P., Offenbacher, S. & Beck, J. D. (1997). Influence of risk factors on the pathogenesis of periodontitis, *Periodontol 2000*, **14**, 173-201.
23. Reddy, M. S., Geurs, N. C. & Gunsolley, J. C. (2003). Periodontal host modulation with antiproteinase, anti-inflammatory, and bone-sparing agents. A systematic review, *Ann Periodontol / Am Acad Periodontol*, **8**, 12-37.
24. Tonetti, M. S. & Chapple, I. L. (2011). Biological approaches to the development of novel periodontal therapies--consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology, *J Clin Periodontol*, **38**, 114-118.
25. Reddy, M. S., Weatherford, T. W., 3rd, Smith, C. A., West, B. D., Jeffcoat, M. K. & Jacks, T. M. (1995). Alendronate treatment of naturally-occurring periodontitis in beagle dogs, *J Periodontol*, **66**, 211-217.
26. Reddy, M. S., Palcanis, K. G., Barnett, M. L., Haigh, S., Charles, C. H. & Jeffcoat, M. K. (1993). Efficacy of meclufenamate sodium (Meclomen) in the treatment of rapidly progressive periodontitis, *J Clin Periodontol*, **20**, 635-640.
27. Golub, L. M., Evans, R. T., McNamara, T. F., Lee, H. M. & Ramamurthy, N. S. (1994). A non-antimicrobial tetracycline inhibits gingival matrix metalloproteinases and bone loss in Porphyromonas gingivalis-induced periodontitis in rats, *Ann NY Acad Sci*, **732**, 96-111.
28. Menezes, A. M., Rocha, F. A., Chaves, H. V., Carvalho, C. B., Ribeiro, R. A. & Brito, G. A. (2005). Effect of sodium alendronate on alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats, *J Periodontol*, **76**, 1901-1909.
29. Reynolds, J. J. & Meikle, M. C. (1997). Mechanisms of connective tissue matrix destruction in periodontitis, *Periodontol 2000*, **14**, 144-157.
30. Golub, L. M., Lee, H. M., Lehrer, G., Nemiroff, A., McNamara, T. F., Kaplan, R. & Ramamurthy, N. S. (1983). Minocycline reduces gingival collagenolytic activity during diabetes. Preliminary observations and a proposed new mechanism of action, *J Periodontal Res*, **18**, 516-526.
31. Brunsvold, M. A., Chaves, E. S., Kornman, K. S., Aufdemorte, T. B. & Wood, R. (1992). Effects of a bisphosphonate on experimental periodontitis in monkeys, *J periodontol*, **63**, 825-830.
32. Williams, R. C., Jeffcoat, M. K., Howell, T. H., Rolla, A., Stubbs, D., Teoh, K. W., Reddy, M. S. & Goldhaber, P. (1989). Altering the progression of human alveolar bone loss with the non-steroidal anti-inflammatory drug flurbiprofen, *J Periodontol*, **60**, 485-490.
33. Schewe, C., Klocking, R., Helbig, B. & Schewe, T. (1991). Lipoxxygenase-inhibitory action of antiviral polymeric oxidation products of polyphenols, *Biomed Biochim Acta*, **50**, 299-305.

34. Naude, P. J., Cromarty, A. D. & van Rensburg, C. E. (2010). Potassium humate inhibits carrageenan-induced paw oedema and a graft-versus-host reaction in rats, *Inflammopharmacology*, **18**, 33-39.
35. Junek, R., Morrow, R., Schoenherr, J. I., Schubert, R., Kallmeyer, R., Phull, S. & Klocking, R. (2009). Bimodal effect of humic acids on the LPS-induced TNF-alpha release from differentiated U937 cells, *Phytomed : Int J Phytother Phytopharmacol*, **16**, 470-476.
36. Klocking, R., Helbig, B. (2005). Medical aspects and applications of Humic Substance, *Biopolymers for Medical and Pharmaceutical Applications*, Wiley-VCH Weinheim, 3-16.
37. Schepetkin I, K. A., Kwon BS. (2002). Medical drugs from humus matter: focus on mumie, *Drug Dv Res*, **57**, 140-159.
38. Islam KMS, S. A. a. G. J. (2005). Humic Acid Substances in Animal Agriculture, *Pak J Nutr*, **4**, 126-134.
39. Senesi, N., et al. (1991). Characterization, differentiation, and classification of humic substances by fluorescence spectroscopy, *Soil Sci*, **152**, 259-271.
40. Davies, G. (1996). Properties and functions of Humic acids, Meeting report. The Nucleus.
41. Orlov, D. S. (1997). Humic substances in the biosphere, *Soros Obraz Zh*, **2**, 56-63.
42. Tonetti, M. S. & Claffey, N. (2005). Advances in the progression of periodontitis and proposal of definitions of a periodontitis case and disease progression for use in risk factor research. Group C consensus report of the 5th European Workshop in Periodontology, *J Clin Periodontol*, **32**, 210-213.
43. Graves, D. (2008). Cytokines that promote periodontal tissue destruction, *J Periodontol*, **79**, 1585-1591.
44. Liu, Y. C., Lerner, U. H. & Teng, Y. T. (2010). Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles, *Periodontol 2000*, **52**, 163-206.
45. Mariotti, A. (1999). Dental plaque-induced gingival diseases, *Ann Periodontol / Am Acad Periodontol*, **4**, 7-19.
46. Flemmig, T. F. (1999). Periodontitis, *Ann Periodontol / Am Acad Periodontol*, **4**, 32-38.
47. Kamer, A. R., Craig, R. G., Dasanayake, A. P., Brys, M., Glodzik-Sobanska, L. & de Leon, M. J. (2008). Inflammation and Alzheimer's disease: possible role of periodontal diseases, *Alzheimer's & dementia : J Alzheimer Assoc*, **4**, 242-250.
48. Page, R. C. (1998). The pathobiology of periodontal diseases may affect systemic diseases: inversion of a paradigm, *Ann Periodontol / Am Acad Periodontol*, **3**, 108-120.
49. Aas, J. A., Paster, B. J., Stokes, L. N., Olsen, I. & Dewhirst, F. E. (2005). Defining the normal bacterial flora of the oral cavity, *J Clin Microbiol*, **43**, 5721-5732.
50. Cullinan, M. P., Ford, P. J. & Seymour, G. J. (2009). Periodontal disease and systemic health: current status, *Aust Dent J*, **54**, S62-S69.
51. Baker, P. J. (2000). The role of immune responses in bone loss during periodontal disease, *Microbes Infect / Institut Pasteur*. **2**, 1181-1192.
52. ter Steeg, P. F., Van der Hoeven, J. S., de Jong, M. H., van Munster, P. J. & Jansen, M. J. (1987). Enrichment of subgingival microflora on human serum leading to accumulation of Bacteroides species, Peptostreptococci and Fusobacteria, *Antonie van Leeuwenhoek*, **53**, 261-272.
53. Marsh, P. D., McDermid, A. S., McKee, A. S. & Baskerville, A. (1994). The effect of growth rate and haemin on the virulence and proteolytic activity of Porphyromonas gingivalis W50, *Microbiology*, **140**, 861-865.

54. Davey, M. E. & O'Toole G, A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics, *Microbiol Mol Biol Rev: MMBR*, **64**, 847-867.
55. Liu, Y. Q., Liu, Y. & Tay, J. H. (2004). The effects of extracellular polymeric substances on the formation and stability of biogranules, *App Microbiol Biotechnol*, **65**, 143-148.
56. Marsh, P.D., Martin, M.V. (2009). Dental plaque. In *Oral microbiology*. Churchill Livingstone Elsevier, **Fifth edition**, 74-102.
57. Rose, N. N. (1992). Manuel of Clinical Laboratory Immunology, *American Society for Microbiology*. Washington, **Fourth Edition**.
58. Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (1994). Evidence of bacterial etiology: a historical perspective, *Periodontol 2000*, **5**, 7-25.
59. Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C. & Kent, R. L., Jr. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque, *J Clin Periodontol*, **25**, 134-144.
60. Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (2005). Periodontal microbial ecology, *Periodontol 2000*, **38**, 135-187.
61. Kinane, D. F. (2001). Causation and pathogenesis of periodontal disease, *Periodontol 2000*, **25**, 8-20.
62. Roitt I, B. J., Male D. (1996). *Immunology*. Mosby, Barcelona, Spain, **Fourth Edition**.
63. Dennison, D. K. & Van Dyke, T. E. (1997). The acute inflammatory response and the role of phagocytic cells in periodontal health and disease, *Periodontol 2000*, **14**, 54-78.
64. Ryder, M. I. (2010). Comparison of neutrophil functions in aggressive and chronic periodontitis, *Periodontol 2000*, **53**, 124-137.
65. Genco, R. J. (1992). Host responses in periodontal diseases: current concepts, *J Periodontol*, **63**, 338-355.
66. Darveau, R. P., Tanner, A. & Page, R. C. (1997). The microbial challenge in periodontitis, *Periodontol 2000*, **14**, 12-32.
67. Schwartz, J., Stinson, F. L. & Parker, R. B. (1972). The passage of tritiated bacterial endotoxin across intact gingival crevicular epithelium, *J Periodontol*, **43**, 270-276.
68. Caffesse, R. G. & Nasjleti, C. E. (1976). Enzymatic penetration through intact sulcular epithelium, *J Periodontol*, **47**, 391-397.
69. Christner, P. (1980). Collagenase in the human periodontal ligament, *J Periodontol*, **51**, 455-461.
70. Kunimatsu, K., Yamamoto, K., Ichimaru, E., Kato, Y. & Kato, I. (1990). Cathepsins B, H and L activities in gingival crevicular fluid from chronic adult periodontitis patients and experimental gingivitis subjects, *J Periodontal Res*, **25**, 69-73.
71. Cox, S. W. & Eley, B. M. (1989). Detection of cathepsin B- and L-, elastase-, tryptase-, trypsin-, and dipeptidyl peptidase IV-like activities in crevicular fluid from gingivitis and periodontitis patients with peptidyl derivatives of 7-amino-4-trifluoromethyl coumarin, *J Periodontal Res*, **24**, 353-361.
72. Ishikawa, I. & Cimasoni, G. (1970). Alkaline phosphatase in human gingival fluid and its relation to periodontitis, *Arch Oral Biol*, **15**, 1401-1404.
73. Lamster, I. B., Mandella, R. D. & Gordon, J. M. (1985). Lactate dehydrogenase activity in gingival crevicular fluid collected with filter paper strips: analysis in subjects with non-inflamed and mildly inflamed gingiva, *J Clin Periodontol*, **12**, 153-161.
74. Oshrain, R. L., Lamster, I. B., Hartley, L. J. & Gordon, J. M. (1984). Arylsulphatase activity in human gingival crevicular fluid, *Arch Oral Biol*, **29**, 399-402.

75. Masada, M. P., Persson, R., Kenney, J. S., Lee, S. W., Page, R. C. & Allison, A. C. (1990). Measurement of interleukin-1 alpha and -1 beta in gingival crevicular fluid: implications for the pathogenesis of periodontal disease, *J Periodontal Res*, **25**, 156-163.
76. Schwartz, Z., Goultschin, J., Dean, D. D. & Boyan, B. D. (1997). Mechanisms of alveolar bone destruction in periodontitis, *Periodontol 2000*, **14**, 158-172.
77. Madden, T. E. & Caton, J. G. (1994). Animal models for periodontal disease, *Meth Enzymol*, **235**, 106-119.
78. Griffiths, G. S., Wilton, J. M., Curtis, M. A., Maiden, M. F., Gillett, I. R., Wilson, D. T., Sterne, J. A. & Johnson, N. W. (1988). Detection of high-risk groups and individuals for periodontal diseases. Clinical assessment of the periodontium, *J Clin Periodontol*, **15**, 403-410.
79. Weinberg, M. A. & Bral, M. (1999). Laboratory animal models in periodontology, *J Clin Periodontol*, **26**, 335-340.
80. Struillou, X., Boutigny, H., Soueidan, A. & Layrolle, P. (2010). Experimental animal models in periodontology: a review, *Open Dent J*, **4**, 37-47.
81. Yamasaki, A., Nikai, H., Niitani, K. & Ijuhin, N. (1979). Ultrastructure of the junctional epithelium of germfree rat gingiva, *J Periodontol*, **50**, 641-648.
82. Peruzzo, D. C., Benatti, B. B., Antunes, I. B., Andersen, M. L., Sallum, E. A., Casati, M. Z., Nociti, F. H. & Nogueira-Filho, G. R. (2008). Chronic stress may modulate periodontal disease: a study in rats, *J Periodontol*, **79**, 697-704.
83. Klausen, B. (1991). Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article, *J Periodontol*, **62**, 59-73.
84. Page R, S. H. (1982). *Periodontitis in man and other animals. a comparative review.*, Basel: Karger.
85. Navia, J. M. (1977). *Animal models in dental research.*, University of Alabama Press, Birmingham, AL.
86. Listgarten, M. A. (1975). Similarity of epithelial relationships in the gingiva of rat and man, *J Periodontol*, **46**, 677-680.
87. Hardt, A. B. (1988). Bisphosphonate effects on alveolar bone during rat molar drifting, *J Dent Res*, **67**, 1430-1433.
88. Romanowski, A. W., Squier, C. A. & Lesch, C. A. (1988). Permeability of rodent junctional epithelium to exogenous protein, *J Periodontal Res*, **23**, 81-86.
89. Ijuhin, N. (1988). Light and electron microscopic studies of experimentally-induced pathologic changes in the rat periodontal tissue, *Adv Dent Res*, **2**, 209-214.
90. Lekic, P., Klausen, B., Friis-Hasche, E., Beloica, D., Knezevic, M. & Hougen, H. P. (1989). Influence of age and immunization on development of gingivitis in rats, *Acta Odonto Scan*, **47**, 233-238.
91. Klausen, B., Hougen, H. P., Hjort Eriksen, W. & Fiehn, N. E. (1986). Induction of periodontal bone loss in athymic (nude) rats monoinfected with streptococcus mutans, *J Periodontal Res*, **21**, 5-12.
92. Garant, P. R. (1976). Light and electron microscopic observations of osteoclastic alveolar bone resorption in rats monoinfected with *Actinomyces naeslundii*, *J Periodontol*, **47**, 717-723.
93. Irving, J. T., Socransky, S. S. & Heeley, J. D. (1974). Histological changes in experimental periodontal disease in gnotobiotic rats and conventional hamsters, *J Periodontal Res*, **9**, 73-80.

94. Heijl, L., Wennstrom, J., Lindhe, J. & Socransky, S. S. (1980). Periodontal disease in gnotobiotic rats, *J Periodontal Res*, **15**, 405-419.
95. Garrison, S. W. & Nichols, F. C. (1989). LPS-elicited secretory responses in monocytes: altered release of PGE2 but not IL-1 beta in patients with adult periodontitis, *J Periodontal Res*, **24**, 88-95.
96. Bidwell, J., Keen, L., Gallagher, G., Kimberly, R., Huizinga, T., McDermott, M. F., Oksenberg, J., McNicholl, J., Pociot, F., Hardt, C. & D'Alfonso, S. (1999). Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, *Gene Immun*, **1**, 3-19.
97. Dinarello, C. A. (2000). Proinflammatory cytokines, *Chest*, **118**, 503-508.
98. Dinarello, C. A. (2009). Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family, *Ann Rev Immunol*, **27**, 519-550.
99. Taylor, J. J. (2010). Cytokine regulation of immune responses to *Porphyromonas gingivalis*, *Periodontol 2000*, **54**, 160-194.
100. Balkwill, F. R. & Burke, F. (1989). The cytokine network, *Immunol today*, **10**, 299-304.
101. Gaffen, S. L. & 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**, 817-828.
102. Dinarello, C. A. (1996). Biologic basis for interleukin-1 in disease, *Blood*, **87**, 2095-2147.
103. Yavuzylmaz, E., Yamalik, N., Bulut, S., Ozen, S., Ersoy, F. & Saatci, U. (1995). The gingival crevicular fluid interleukin-1 beta and tumour necrosis factor-alpha levels in patients with rapidly progressive periodontitis, *Aust Dent J*, **40**, 46-49.
104. Meikle, M. C., Heath, J. K. & Reynolds, J. J. (1986). Advances in understanding cell interactions in tissue resorption. Relevance to the pathogenesis of periodontal diseases and a new hypothesis, *J Oral Pathol*, **15**, 239-250.
105. Matsuki, Y., Yamamoto, T. & 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**, 42-47.
106. Tatakis, D. N. (1993). Interleukin-1 and bone metabolism: a review, *J Periodontol*, **64**, 416-431.
107. Tokoro, Y., Yamamoto, T. & Hara, K. (1996). IL-1 beta mRNA as the predominant inflammatory cytokine transcript: correlation with inflammatory cell infiltration into human gingiva, *J Oral Pathol Med : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the Am Acad Oral Pathol*, **25**, 225-231.
108. Stashenko, P., Dewhirst, F. E., Peros, W. J., Kent, R. L. & Ago, J. M. (1987). Synergistic interactions between interleukin 1, tumor necrosis factor, and lymphotoxin in bone resorption, *J Immunol*, **138**, 1464-1468.
109. Dinarello, C. A. (1991). Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism, *Blood*, **77**, 1627-1652.
110. Horowitz, M. C. (1993). Cytokines and estrogen in bone: anti-osteoporotic effects, *Science*, **260**, 626-627.
111. Barksby, H. E., Nile, C. J., Jaedicke, K. M., Taylor, J. J. & Preshaw, P. M. (2009). Differential expression of immunoregulatory genes in monocytes in response to *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli* lipopolysaccharide, *Clin Exp Immunol*, **156**, 479-487.

112. Ben-Sasson, S. Z., Hu-Li, J., Quiel, J., Cauchetaux, S., Ratner, M., Shapira, I., Dinarello, C. A. & Paul, W. E. (2009). IL-1 acts directly on CD4 T cells to enhance their antigen-driven expansion and differentiation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 7119-7124.
113. Matsuki, Y., Yamamoto, T. & Hara, K. (1993). Localization of interleukin-1 (IL-1) mRNA-expressing macrophages in human inflamed gingiva and IL-1 activity in gingival crevicular fluid, *J Periodontal Res*, **28**, 35-42.
114. Stashenko, P., Fujiyoshi, P., Obernesser, M. S., Prostack, L., Haffajee, A. D. & Socransky, S. S. (1991). Levels of interleukin 1 beta in tissue from sites of active periodontal disease, *J Clin Periodontol*, **18**, 548-554.
115. Heasman, P. A., Collins, J. G. & Offenbacher, S. (1993). Changes in crevicular fluid levels of interleukin-1 beta, leukotriene B4, prostaglandin E2, thromboxane B2 and tumour necrosis factor alpha in experimental gingivitis in humans, *J Periodontal Res*, **28**, 241-247.
116. Lee, H. J., Kang, I. K., Chung, C. P. & Choi, S. M. (1995). The subgingival microflora and gingival crevicular fluid cytokines in refractory periodontitis, *J Clin Periodontol*, **22**, 885-890.
117. Koide, M., Suda, S., Saitoh, S., Ofuji, Y., Suzuki, T., Yoshie, H., Takai, M., Ono, Y., Taniguchi, Y. & Hara, K. (1995). In vivo administration of IL-1 beta accelerates silk ligature-induced alveolar bone resorption in rats, *J Oral Pathol Med : official publication of the International Association of Oral Pathologists and Am Acad Oral Pathol*, **24**, 420-434.
118. Mizel, S. B. (1982). Interleukin 1 and T cell activation, *Immunol Rev*, **63**, 51-72.
119. Chiplunkar, S., Langhorne, J. & Kaufmann, S. H. (1986). Stimulation of B cell growth and differentiation by murine recombinant interleukin 1, *J Immunol*, **137**, 3748-3752.
120. Gowen, M. & Mundy, G. R. (1986). Actions of recombinant interleukin 1, interleukin 2, and interferon-gamma on bone resorption in vitro, *J Immunol*, **136**, 2478-2482.
121. Sauder, D. N., Mounessa, N. L., Katz, S. I., Dinarello, C. A. & Gallin, J. I. (1984). Chemotactic cytokines: the role of leukocytic pyrogen and epidermal cell thymocyte-activating factor in neutrophil chemotaxis, *J Immunol*, **132**, 828-832.
122. Westmacott, D., Wadsworth, J. & Bloxham, D. P. (1987). Chemotactic activity of recombinant human interleukin-1, *Agents and actions*, **21**, 323-324.
123. Reinhardt, R. A., Masada, M. P., Kaldahl, W. B., DuBois, L. M., Kornman, K. S., Choi, J. I., Kalkwarf, K. L. & Allison, A. C. (1993). Gingival fluid IL-1 and IL-6 levels in refractory periodontitis, *J Clin Periodontol*, **20**, 225-231.
124. Weiss, J. M., Sundar, S. K., Becker, K. J. & Cierpial, M. A. (1989). Behavioral and neural influences on cellular immune responses: effects of stress and interleukin-1, *J Clin Psychiatr*, **50**, 43-53; discussion 54-55.
125. Moore, K. W., O'Garra, A., de Waal Malefyt, R., Vieira, P. & Mosmann, T. R. (1993). Interleukin-10, *Ann Rev Immunol*, **11**, 165-190.
126. Commins, S., Steinke, J. W. & Borish, L. (2008). The extended IL-10 superfamily: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, and IL-29, *J Allergy Clin Immunol*, **121**, 1108-1111.
127. Couper, K. N., Blount, D. G. & Riley, E. M. (2008). IL-10: the master regulator of immunity to infection, *J Immunol*, **180**, 5771-5777.
128. de Waal Malefyt, R., Yssel, H., Roncarolo, M. G., Spits, H. & de Vries, J. E. (1992). Interleukin-10, *Curr Opin Immunol*, **4**, 314-320.

129. Sasaki, H., Okamatsu, Y., Kawai, T., Kent, R., Taubman, M. & Stashenko, P. (2004). The interleukin-10 knockout mouse is highly susceptible to *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone loss, *J Periodontal Res*, **39**, 432-441.
130. Bozkurt, F. Y., Yetkin Ay, Z., Berker, E., Tepe, E. & Akkus, S. (2006). Anti-inflammatory cytokines in gingival crevicular fluid in patients with periodontitis and rheumatoid arthritis: a preliminary report, *Cytokine*, **35**, 180-185.
131. Honda, T., Domon, H., Okui, T., Kajita, K., Amanuma, R. & Yamazaki, K. (2006). Balance of inflammatory response in stable gingivitis and progressive periodontitis lesions, *Clin Exp Immunol*, **144**, 35-40.
132. Seymour, G. J. & Gemmell, E. (2001). Cytokines in periodontal disease: where to from here?, *Acta Odontol Scand*, **59**, 167-173.
133. Cassatella, M. A., Meda, L., Bonora, S., Ceska, M. & Constantin, G. (1993). Interleukin 10 (IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 beta in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide, *J Exp Med*, **178**, 2207-2211.
134. Cassatella, M. A., Meda, L., Gasperini, S., Calzetti, F. & Bonora, S. (1994). Interleukin 10 (IL-10) upregulates IL-1 receptor antagonist production from lipopolysaccharide-stimulated human polymorphonuclear leukocytes by delaying mRNA degradation, *J Exp Med*, **179**, 1695-1699.
135. Lacraz, S., Nicod, L. P., Chicheportiche, R., Welgus, H. G. & Dayer, J. M. (1995). IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes, *J Clin Invest*, **96**, 2304-2310.
136. Graves, D. T. & Cochran, D. (2003). The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction, *J Periodontol*, **74**, 391-401.
137. Katagiri, T. & Takahashi, N. (2002). Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation, *Oral Dis*, **8**, 147-159.
138. Taubman, M. A. & Kawai, T. (2001). Involvement of T-lymphocytes in periodontal disease and in direct and indirect induction of bone resorption, *Crit Rev Oral Biol Med : an official publication of the American Association of Oral Biologists*, **12**, 125-135.
139. Gemmell, E. & Seymour, G. J. (2004). Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease, *Periodontol 2000*, **35**, 21-41.
140. Birkedal-Hansen, H. (1993). Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases, *J Periodontol*, **64**, 474-484.
141. Lappin, D. F., MacLeod, C. P., Kerr, A., Mitchell, T. & Kinane, D. F. (2001). Anti-inflammatory cytokine IL-10 and T cell cytokine profile in periodontitis granulation tissue, *ClinExp Immunol*, **123**, 294-300.
142. Tokoro, Y., Matsuki, Y., Yamamoto, T., Suzuki, T. & Hara, K. (1997). Relevance of local Th2-type cytokine mRNA expression in immunocompetent infiltrates in inflamed gingival tissue to periodontal diseases, *Clin Exp Immunol*, **107**, 166-174.
143. Garlet, G. P., Cardoso, C. R., Silva, T. A., Ferreira, B. R., Avila-Campos, M. J., Cunha, F. Q. & Silva, J. S. (2006). Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors, *Oral Microbiol Immunol*, **21**, 12-20.

144. Passoja, A., Puijola, I., Knuuttila, M., Niemela, O., Karttunen, R., Raunio, T. & Tervonen, T. (2010). Serum levels of interleukin-10 and tumour necrosis factor-alpha in chronic periodontitis, *J Clin Periodontol*, **37**, 881-887.
145. Kornman, K. S. (1999). Host modulation as a therapeutic strategy in the treatment of periodontal disease, *Clin Infect Dis : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, **28**, 520-526.
146. Preshaw, P. M. (2008). Host response modulation in periodontics, *Periodontol 2000*, **48**, 92-110.
147. Ingman, T., Sorsa, T., Suomalainen, K., Halinen, S., Lindy, O., Lauhio, A., Saari, H., Konttinen, Y. T. & Golub, L. M. (1993). Tetracycline inhibition and the cellular source of collagenase in gingival crevicular fluid in different periodontal diseases. A review article, *J Periodontol*, **64**, 82-88.
148. Vernillo, A. T., Ramamurthy, N. S., Golub, L. M. & Rifkin, B. R. (1994). The nonantimicrobial properties of tetracycline for the treatment of periodontal disease, *Curr Opin Periodontol*, 111-118.
149. Golub, L. M., Sorsa, T., Lee, H. M., Ciancio, S., Sorbi, D., Ramamurthy, N. S., Gruber, B., Salo, T. & Konttinen, Y. T. (1995). Doxycycline inhibits neutrophil (PMN)-type matrix metalloproteinases in human adult periodontitis gingiva, *J Clin Periodontol*, **22**, 100-109.
150. Sato, M., Grasser, W., Endo, N., Akins, R., Simmons, H., Thompson, D. D., Golub, E. & Rodan, G. A. (1991). Bisphosphonate action. Alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure, *J Clin Invest*, **88**, 2095-2105.
151. Van Dyke, T. E. & Serhan, C. N. (2003). Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases, *J Dent Res*, **82**, 82-90.
152. Howell, T. H. & Williams, R. C. (1993). Nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of periodontal disease progression, *Crit Rev Oral Biol Med : an official publication of the American Association of Oral Biologists*, **4**, 177-196.
153. Dizman, M., Tutar, A., Karaman, M.R., Turan, M., Horuz, A.(2012). Hümik maddelerin ilaç olarak kullanımı ve insan sağlığına etkileri, *SAÜ Fen Edebiyat Dergisi*, **1**, 25-33.
154. Kuhnert, M., Fuchs, V. & Golbs, S. (1982). [Chemical characterization and pharmacologic and toxicologic peculiarities of humic acid], *Arch Exp Veterinarmed*, **36**, 169-177.
155. Visser, S. A. (1986). *Effects of humic substances on plant growth.*, Reda, Rome.
156. Vaughan, D., Malcolm, R.E., Ord, B.G. (1985). *Influence of humic substances on biochemical processes in plants.*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
157. Vengerovskii, A. I., Golovina, E. L., Burkova, V. N. & Saratikov, A. S. (2001). [Enteric sorbents potentiate hepatoprotective effect of eplir in experimental toxic hepatitis], *Eksp Klin Farmakol*, **64**, 46-48.
158. Joone, G. K. & van Rensburg, C. E. (2004). An in vitro investigation of the anti-inflammatory properties of potassium humate, *Inflammation*, **28**, 169-174.
159. Salz, H. (1974). [Salhumin-gel, a local therapeutic agent with hyperemic, antiphlogistic and analgesic effect], *Medizinische Monatsschrift*, **28**, 548-550.
160. Bellometti, S., Giannini, S., Sartori, L. & Crepaldi, G. (1997). Cytokine levels in osteoarthritis patients undergoing mud bath therapy, *Int J Clin Pharmacol Res*, **17**, 149-153.

161. Iubitskaia, N. S. & Ivanov, E. M. (1999). [Sodium humate in the treatment of osteoarthritis patients], *Vopr Kurortol Fizioter Lech Fiz Kult*, 22-24.
162. Burdon, J. (2001). Are the traditional concepts of the structures of humic substances realistic?, *Soil Sci*, **166**, 752-769.
163. Davies, G., Ghabbour, E.A., Steelink, C. (2001). Humic acids: Marvelous products of soil chemistry., *J Chem Educ*, **78**, 1609-1614.
164. Kurkova, M., Klika, Z., Klikova, C. & Havel, J. (2004). Humic acids from oxidized coals I. Elemental composition, titration curves, heavy metals in HA samples, nuclear magnetic resonance spectra of HAs and infrared spectroscopy, *Chemosphere*, **54**, 1237-1245.
165. Brzozowski, T., Dembinski, A. & Konturek, S. (1994). Influence of Tolpa Peat Preparation on gastroprotection and on gastric and duodenal ulcers, *Acta Pol Pharma*, **51**, 103-107.
166. Yamada, E., Ozaki, T., Kimura M. (1998). Determination and behavior of humic substances as precursors of trihalomethane in environmental water., *Anal Sci*, **14**, 327-332.
167. Ansorg, R. & Rochus, W. (1978). [Studies on the antimicrobial effect of natural and synthetic humic acids (author's transl)], *ArzneimForsch*, **28**, 2195-2198.
168. Skliar, T. V., Krysenko, A. V., Gavriiliuk, V. G. & Vinnikov, A. I. (1998). [A comparison of the developmental characteristics of *Neisseria gonorrhoeae* and *Staphylococcus aureus* cultures on nutrient media of different compositions], *Mikrobiol Z*, **60**, 25-30.
169. Klocking, R. & Sprossig, M. (1972). Antiviral properties of humic acids, *Experientia*, **28**, 607-608.
170. Thiel, K. D., Klocking, R., Schweizer, H. & Sprossig, M. (1977). [In vitro studies of the antiviral activity of ammonium humate against herpes simplex virus type 1 and type 2 (author's transl)], *Zentralbl Bakt Parasitenkd Infektionskr Hyg Erste Abt Orig Reihe A: Med Mikrobiol Parasitol*, **239**, 304-321.
171. Thiel, K. D., Helbig, B., Klocking, R., Wutzler, P., Sprossig, M. & Schweizer, H. (1981). [Comparison of the in vitro activities of ammonium humate and of enzymically oxidized chlorogenic and caffeic acids against type 1 and type 2 human herpes virus (author's transl)], *Die Pharmazie*, **36**, 50-53.
172. Schiller, F., Klocking, R., Wutzler, P. & Farber, I. (1979). [Results of an oriented clinical trial of ammonium humate for the local treatment of herpesvirus hominis (HVH) infections], *Dermatol Monatschrift*, **165**, 505-509.
173. Klocking, R., Helbig, B., Schotz, G., Schacke, M. & Wutzler, P. (2002). Anti-HSV-1 activity of synthetic humic acid-like polymers derived from p-diphenolic starting compounds, *Antivir Chem Chemother*, **13**, 241-249.
174. Schneider, J., Weis, R., Manner, C., Kary, B., Werner, A., Seubert, B. J. & Riede, U. N. (1996). Inhibition of HIV-1 in cell culture by synthetic humate analogues derived from hydroquinone: mechanism of inhibition, *Virology*, **218**, 389-395.
175. van Rensburg, C. E., Dekker, J., Weis, R., Smith, T. L., Janse van Rensburg, E. & Schneider, J. (2002). Investigation of the anti-HIV properties of oxihumate, *Chemotherapy*, **48**, 138-143.
176. Joone, G. K., Dekker, J. & van Rensburg, C. E. (2003). Investigation of the immunostimulatory properties of oxihumate, *Zeitschrift fur Naturforschung C, J Biosci*, **58**, 263-267.

177. Tkachenko, S. S., Rutsikii, V. V. & Grachev, I. R. (1979). [Reparative regeneration of the bone tissue under the effect of mumie-asy], *Ortop Travmatol Protez*, **11**, 49-52.
178. Kel'ginbaev, N. S., Sorokina, V. A., Stefanidu, A. G. & Ismailova, V. N. (1973). [Treatment of long tubular bone fractures with Mumie Assil preparations in experiments and clinical conditions], *Eksp KhirAnesteziol*, **18**, 31-35.
179. Schols, D., Wutzler, P., Klocking, R., Helbig, B. & De Clercq, E. (1991). Selective inhibitory activity of polyhydroxycarboxylates derived from phenolic compounds against human immunodeficiency virus replication, *JAcq Imm Def Syn*, **4**, 677-685.
180. Neyts, J., Snoeck, R., Schols, D., Balzarini, J., Esko, J. D., Van Schepdael, A. & De Clercq, E. (1992). Sulfated polymers inhibit the interaction of human cytomegalovirus with cell surface heparan sulfate, *Virology*, **189**, 48-58.
181. R., K. (1994). Humic substances as potential therapeutics, Elsevier., Amsterdam, London, New York, Tokyo.
182. Dürre, K., Schindler, S. (1992). *Austestung anti-viraler Substanzen an der rezidivierenden kutanen Herpes-simplex-Virus-Infektion der Maus unter Berücksichtigung des Einflusses von Penetrationsvermittlern.*
183. Lu, F. J., Tseng, S. N., Li, M. L. & Shih, S. R. (2002). In vitro anti-influenza virus activity of synthetic humate analogues derived from protocatechuic acid, *Arch virol*, **147**, 273-284.
184. Taugner, B. (1963). Tierexperimentelle Untersuchungen über ein Natriumhuminat-SalicylsaureBad, *ArzneimForsch*, **13**, 329-333.
185. Klocking R, H. R., Mücke D. (1968). Tierexperimentelle Untersuchungen zur entzündungshemmenden Wirkung von Humaten, *ArzneimForsch*, **18**, 941-942.
186. Kreutz B, S. W. (1992). Effects of implanted bovine calcium hydroxyapatite with humate., *Arch Orthop Trauma Surg*, **111**, 259-264.
187. Goel, R. K., Banerjee, R. S. & Acharya, S. B. (1990). Antiulcerogenic and antiinflammatory studies with shilajit, *J Ethnopharmacol*, **29**, 95-103.
188. Gau, R. J., Yang, H. L., Chow, S. N., Suen, J. L. & Lu, F. J. (2000). Humic acid suppresses the LPS-induced expression of cell-surface adhesion proteins through the inhibition of NF-kappaB activation, *Toxicol App Pharmacol*, **166**, 59-67.
189. Buczko, W., Malinowska, B., Pietraszek, M. H., Pawlak, D. & Chabielska, E. (1993). Influence of Tolpa Peat Preparation on haemostasis in rats, *Acta Pol Pharma*, **50**, 507-511.
190. Lotosh, T. D. (1991). [Experimental bases and prospects for the use of humic acid preparations from peat in medicine and agricultural production], *Nauchnye doklady vysshei shkoly Biologicheskije nauki*, 99-103.
191. Dabovich, L. A., L. Hulbert, A. Rudine, S. Kim., F. Ji and J.J. McGlone (2003). Evaluation of nutraceutical effects on pig immunity: Effects of Promox. in *2003 Southern Section ASAS meeting* Pork Industry Institute, Department of Animal and Food Science, Texas Tech University, Lubbock, TX 79409.
192. Kodama, H. e. a. (2007). Antitumor effect of humus extract on murine transplantable L1210 Leukemia, *J Vet Med Sci*, **69**, 1069-1071.
193. Vucskits, A. V., Hullar, I., Bersenyi, A., Andrasofszky, E., Kulcsar, M. & Szabo, J. (2010). Effect of fulvic and humic acids on performance, immune response and thyroid function in rats, *J Anim Physiol Anim Nutr*, **94**, 721-728.
194. Bernacchi, F., Ponzanelli, I., Minunni, M., Falezza, A., Loprieno, N. & Barale, R. (1996). In vivo cytogenetic effects of natural humic acid, *Mutagenesis*, **11**, 467-469.

195. Dos Santos, A., Botero, W. A., Bellin, I. C., Oliveira, L. & C., R., J. C., Mendonca, A. G. R., Godinho, A. F. (2007). Humic substances and metallic ions: a selective study of humic substances and their possible therapeutic application, *J Brazil Chem Soc*, **18**, 824-830.
196. Van Rensburg, C. E., Snyman, J. R., Mokoele, T. & Cromarty, A. D. (2007). Brown coal derived humate inhibits contact hypersensitivity; an efficacy, toxicity and teratogenicity study in rats, *Inflammation*, **30**, 148-152.
197. Seymour, G. J. (1991). Importance of the host response in the periodontium, *J Clin Periodontol*, **18**, 421-426.
198. Garlet, G. P., Martins, W., Jr., Fonseca, B. A., Ferreira, B. R. & Silva, J. S. (2004). Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease, *J Clin Periodontol*, **31**, 671-679.
199. van Rensburg, C. E. & Naude, P. J. (2009). Potassium humate inhibits complement activation and the production of inflammatory cytokines in vitro, *Inflammation*, **32**, 270-276.
200. Toker, H., Ozdemir, H., Eren, K., Ozer, H. & Sahin, G. (2009). N-acetylcysteine, a thiol antioxidant, decreases alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats, *J Periodontol*, **80**, 672-678.
201. Di Paola, R., Mazzon, E., Maiere, D., Zito, D., Britti, D., De Majo, M., Genovese, T. & Cuzzocrea, S. (2006). Rosiglitazone reduces the evolution of experimental periodontitis in the rat, *J Dent Res*, **85**, 156-161.
202. Di Paola, R., Mazzon, E., Zito, D., Maiere, D., Britti, D., Genovese, T. & Cuzzocrea, S. (2005). Effects of Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, in a rodent model periodontitis, *J Clin Periodontol*, **32**, 1062-1068.
203. Kuhr, A., Popa-Wagner, A., Schmoll, H., Schwahn, C. & Kocher, T. (2004). Observations on experimental marginal periodontitis in rats, *J Periodontal Res*, **39**, 101-106.
204. Vignery, A. & Baron, R. (1980). Dynamic histomorphometry of alveolar bone remodeling in the adult rat, *Anatomic Rec*, **196**, 191-200.
205. Amstad-Jossi, M. & Schroeder, H. E. (1978). Age-related alterations of periodontal structures around the cemento-enamel junction and of the gingival connective tissue composition in germ-free rats, *J Periodontal Res*, **13**, 76-90.
206. de Lima, V., Bezerra, M. M., de Menezes Alencar, V. B., Vidal, F. D., da Rocha, F. A., de Castro Brito, G. A. & de Albuquerque Ribeiro, R. (2000). Effects of chlorpromazine on alveolar bone loss in experimental periodontal disease in rats, *Euro J Oral Sci*, **108**, 123-129.
207. Toker, H., Ozan, F., Ozer, H., Ozdemir, H., Eren, K. & 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**, 1089-1094.
208. Lutfioglu, M., Sakallioglu, U., Sakallioglu, E. E., Diraman, E., Ciftci, G. & Tutkun, F. (2010). Dietary-induced hyperparathyroidism affects serum and gingival proinflammatory cytokine levels in rats, *J Periodontol*, **81**, 150-157.
209. McGee, J. M., Tucci, M. A., Edmundson, T. P., Serio, C. L. & Johnson, R. B. (1998). The relationship between concentrations of proinflammatory cytokines within gingiva and the adjacent sulcular depth, *J Periodontol*, **69**, 865-871.

210. Ishihara, Y., Nishihara, T., Kuroyanagi, T., Shirozu, N., Yamagishi, E., Ohguchi, M., Koide, M., Ueda, N., Amano, K. & Noguchi, T. (1997). Gingival crevicular interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist levels in periodontally healthy and diseased sites, *J Periodontal Res*, **32**, 524-529.
211. Hirose, M., Ishihara, K., Saito, A., Nakagawa, T., Yamada, S. & Okuda, K. (2001). Expression of cytokines and inducible nitric oxide synthase in inflamed gingival tissue, *J Periodontol*, **72**, 590-597.
212. Nibali, L., D'Aiuto, F., Griffiths, G., Patel, K., Suvan, J. & Tonetti, M. S. (2007). Severe periodontitis is associated with systemic inflammation and a dysmetabolic status: a case-control study, *J Clin Periodontol*, **34**, 931-937.
213. Paraskevas, S., Huizinga, J. D. & Loos, B. G. (2008). A systematic review and meta-analyses on C-reactive protein in relation to periodontitis, *J Clin Periodontol*, **35**, 277-290.
214. Saxlin, T., Suominen-Taipale, L., Leiviska, J., Jula, A., Knuuttila, M. & Ylostalo, P. (2009). Role of serum cytokines tumour necrosis factor-alpha and interleukin-6 in the association between body weight and periodontal infection, *J Clin Periodontol*, **36**, 100-105.
215. Dutzan, N., Gamonal, J., Silva, A., Sanz, M. & Vernal, R. (2009). Over-expression of forkhead box P3 and its association with receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand, interleukin (IL) -17, IL-10 and transforming growth factor-beta during the progression of chronic periodontitis, *J Clin Periodontol*, **36**, 396-403.
216. Gorska, R., Gregorek, H., Kowalski, J., Laskus-Perendyk, A., Syczewska, M. & Madalinski, K. (2003). Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis, *J Clin periodontol*, **30**, 1046-1052.
217. Mundy, G. R. (1991). Inflammatory mediators and the destruction of bone, *J Periodontal Res*, **26**, 213-217.
218. Wilson, M., Reddi, K. & Henderson, B. (1996). Cytokine-inducing components of periodontopathogenic bacteria, *J Periodontal Res*, **31**, 393-407.
219. Harada, S. & Rodan, G. A. (2003). Control of osteoblast function and regulation of bone mass, *Nature*, **423**, 349-355.
220. Martin, T. J. & Ng, K. W. (1994). Mechanisms by which cells of the osteoblast lineage control osteoclast formation and activity, *J Cell Biochem*, **56**, 357-366.
221. Ozdemir, H., Kara, M. I., Erciyas, K., Ozer, H. & Ay, S. (2012). Preventive effects of thymoquinone in a rat periodontitis model: a morphometric and histopathological study, *J Periodontal Res*, **47**, 74-80.
222. Nyman, S., Schroeder, H. E. & Lindhe, J. (1979). Suppression of inflammation and bone resorption by indomethacin during experimental periodontitis in dogs, *J Periodontol*, **50**, 450-461.
223. Hou, L. T., Liu, C. M., Liu, B. Y., Lin, S. J., Liao, C. S. & Rossomando, E. F. (2003). Interleukin-1beta, clinical parameters and matched cellular-histopathologic changes of biopsied gingival tissue from periodontitis patients, *J Periodontal Res*, **38**, 247-254.
224. Soliev, T. S. (1983). The treatment of deforming osteoarthritis by non-specific bio-stimulator Mumie, *Med J Uzbek*, **8**, 19-21.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Metin ÇALIŞIR
Doğum Yeri ve Tarihi	Adıyaman 25/12/1983
Medeni Hali	Evli
Yabancı Dil	İngilizce
İletişim Adresi	Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji AD, 58140-SİVAS
E-posta Adresi	calisir_metin@hotmail.com

Eğitim ve Akademik Durumu

Lise	Adıyaman Anadolu Öğretmen Lisesi
Üniversite	Çukurova Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi
Doktora	Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji AD

İş Tecrübesi

Adıyaman Gölbaşı Özel Çınar Tıp Merkezi	Diş Hekimi 2007-2008
Cumhuriyet Üniversitesi	Araştırma Görevlisi 2009-