



**LİPOZOMA HAPSEDİLMİŞ UÇUCU YAĞLARIN  
DENEYSEL PERİODONTİTİSTE  
PERİODONTAL YIKIMA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**HATİCE BALCI YÜCE**

**DOKTORA TEZİ  
BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI  
Prof. Dr. İsa KARAMAN  
Ocak - 2020  
Her hakkı saklıdır**

T.C.  
TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

LİPOZOMA HAPSEDİLMİŞ UÇUCU YAĞLARIN DENEYSEL  
PERİODONTİTİSTE PERİODONTAL YIKIMA ETKİSİNİN  
ARAŞTIRILMASI

HATİCE BALCI YÜCE

TOKAT  
Ocak - 2020

Her hakkı saklıdır



**Bu tez çalışması;**

**Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından 2017/89 nolu proje ile desteklenmiştir.**

**Hatice Balcı Yüce** tarafından hazırlanan “Lipozoma Hapsedilmiş Uçucu Yağların Deneysel Periodontitiste Periodontal Yıkıma Etkisinin Araştırılması” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 9 OCAK 2020 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği / Oy Çokluğu ile Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI’nda DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman  
Prof. Dr. İsa KARAMAN

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi  
Üye  
Prof. Dr. Kamil IŞIK  
19 Mayıs Üniversitesi

Üye  
Prof. Dr. Bilge Hilal ÇADIRCI  
Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi

Üye  
Dr. Öğretim üyesi Mehmet Murat TAŞKAN  
Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi

Üye  
Dr. Öğr. Ü. Hale Gamze AĞALAR  
Anadolu Üniversitesi



Prof. Dr. Cemil CEKİÇ  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

09/01/2020

## TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

HATİCE BALCIYÜCE

27 Aralık 2019

## ÖZET

### DOKTORA TEZİ

## LİPOZOMA HAPSEDİLMİŞ UÇUCU YAĞLARIN DENEYSEL PERİODONTİTİSTE PERİODONTAL YIKIMA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

HATİCE BALCI YÜCE

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. İSA KARAMAN)

Bu çalışmanın amacı tarçın ve karanfil uçucu yağ lipozomlarının deneysel olarak oluşturulmuş periodontitisi önlemedeki etkisinin araştırılmasıdır.

Bu çalışmada 28 adet dişi Wistar cinsi sıçan kullanılmış ve dört çalışma grubu oluşturulmuştur. Grup 1: Kontrol grubu (K), Grup 2: Periodontitis grubu (P), Grup 3: Periodontitis ve tarçın lipozom grubu (TLp), Grup 4: Periodontitis ve karanfil lipozom grubu (KLp). Deneysel periodontitis *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC33384) bakterisinin ağız ortamına inoküle edilmesi ve alt çene sağ birinci büyük azı diş çevresine ipek ligatür bağlanması ile oluşturulmuştur. Sıçanlar 14 gün boyunca tarçın veya karanfil lipozomunun oral gavaj yolu ile verilmesiyle tedavi edilmiş ve bu sürenin sonunda sakrifiye edilmişlerdir. Gruplarda diş çevresindeki kemik kayıp miktarları, enflamatuvar hücre sayısı, osteoblast ve osteoklast hücre sayıları ve indüklenebilir nitrik oksit sentetaz (iNOS), siklooksijenaz-2 (COX-2), nükleer faktör  $\kappa\beta$ 'nın ligandının reseptör aktivatörü (RANKL) ve osteoprotegerin (OPG) ekspresyonları belirlenmiştir. Veriler IBM SPSS istatistik programı ile One Way ANOVA-tukey, Mann Whitney U ve Kruskal Wallis yöntemleri ile değerlendirilmiş ve  $p < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Periodontitis kemik kaybını arttırmış ve tarçın ve karanfil uçucu yağ lipozomları kemik kaybını önemli ölçüde engellemiştir. Gruplarda enflamatuvar hücre sayıları, osteoklast sayıları, iNOS, COX-2 ve RANKL seviyelerinde en düşük seviyeler kontrol grubunda gözlenirken, en yüksek seviyeler periodontitis grubunda gözlenmiştir. Tarçın ve karanfil uçucu yağ lipozomları bu seviyeleri anlamlı düzeyde düşürmüştür. Osteoblast sayıları ve OPG seviyeleri en düşük periodontitis grubunda gözlenmiştir. Tarçın ve karanfil lipozomları bu değerleri yükseltmiştir.

Tarçın ve karanfil uçucu yağlarından elde edilen lipozomlar, periodontitise bağlı enflamasyon ve kemik yıkımını başarılı bir şekilde azaltmıştır.

2020, 97 SAYFA

**ANAHTAR KELİMELELER:** Alveol kemik, Deneysel periodontitis, Karanfil uçucu yağı, Lipozom, Tarçın uçucu yağı

## ABSTRACT

### DOCTORATE THESIS

#### INVESTIGATION OF THE EFFECT OF ESSENTIAL OILS ENTRAPPED IN LYPOSOME ON PERIODONTAL DETSRUCTION IN EXPERIMENTAL PERIODONTİTİS HATİCE BALCI YÜCE

TOKAT GAZİOSMANPASA UNIVERSITY  
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOENGINEERING

(SUPERVISOR:)**PROF. DR. İSA KARAMAN**

The aim of this study was to investigate the effect of cinnamon and clove essential oil liposomes on the prevention of experimentally induced periodontitis.

In this study, 28 female Wistar rats were used and four study groups were formed. Group 1: Control group (K), Group 2: Periodontitis group (P), Group 3: Periodontitis and cinnamon oil liposome group (TLp), Group 4: Periodontitis and clove oil liposome group (KLp). Experimental periodontitis was induced by inoculating *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC33384) into the oral environment and silk ligature ligation around the right first molars of the lower jaw. Rats were treated by oral gavage administration of cinnamon or clove liposomes for 14 days. Alveolar bone loss around the teeth, inflammatory cell counts, osteoblast and osteoclast cell counts and inducible nitric oxide synthetase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), receptor activator of the ligand of nuclear factor  $\kappa\beta$  (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) levels were determined. Data were evaluated with One Way ANOVA-tukey, Mann Whitney U and Kruskal Wallis methods with IBM SPSS statistical program and  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

Periodontitis caused a severe bone loss and cinnamon and clove essential oil liposomes prevented alveolar bone loss. Inflammatory cell numbers, osteoclast numbers, iNOS, COX-2 and RANKL levels were the highest levels in the periodontitis group and innamon and clove oil liposomes reduced these levels. Osteoblast numbers and OPG levels were lower in the periodontitis group and cinnamon and clove essential oil liposomes increased these levels.

Liposomes obtained from essential oils of cinnamon and clove have successfully reduced inflammation and bone destruction caused by periodontitis.

2020, 97 PAGE

**KEYWORDS:** Alveolar bone, Cinnamon essential oil, Clove essential oil, Liposome, Experimental periodontitis.

## ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasının tamamlanmasında emeği geen başta Prof. Dr. İsa KARAMAN'a (Doktora Danışmanım) olmak üzere, Prof. Dr. Bilge Hilal ÇADIRCI EFELİ ve Dr. Öğretim Üyesi Mehmet Murat TAŞKAN'a (Tez İzleme Komitesi Üyeleri), doktora derslerimi aldığım Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik bölümü hocalarına ve tez süresince benden yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Cemil ALKAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

**HATİCE BALCI YÜCE**

**9 Ocak 2020**



## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

ÖZET .....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ .....	iii
İÇİNDEKİLER .....	iv
SİMGE ve KISALTMALAR .....	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	ix
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	4
2.1 Periodontal Hastalıklar.....	4
2.1.1 Periodontitiste enflamasyon.....	8
2.1.2 İndüklenebilir nitrik oksit sentetaz (iNOS).....	9
2.1.3 Siklooksijenaz (COX)-2.....	11
2.2 Kemik Dokusu.....	14
2.2.1 İskelet sistemi ve kemik dokusu.....	14
2.2.2 Kemik yapımı ve mineralizasyon.....	17
2.2.3 Kollajen ve kemik dokusu proteinleri.....	18
2.2.4 Kemik dokusunda modelleme ve yeniden şekillenme (modelling and remodelling).....	19
2.2.5 Osteoblast hücreleri.....	21
2.2.6 Osteoklast hücreleri.....	23
2.2.7 Osteoklast-osteoblast hücre iletişimi ve RANK/RANKL/OPG.....	28
2.2.8 Kemik morfolojisi ve histolojik boyama.....	32

2.3 Deneysel Periodontitis Modelleri.....	33
2.4 Uçucu Yağların Etkileri.....	34
2.4.1 Tarçın uçucu yağı ve biyolojik etkileri.....	34
2.4.2 Karanfil uçucu yağı ve biyolojik etkileri.....	36
2.5 Lipozom.....	38
2.6 Hipotez ve Amaç.....	40
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	42
3.1 Çalışma Tasarımı ve Gruplar.....	42
3.1.2 Deneysel periodontitis oluşturulması ve lipozom uygulaması.....	43
3.1.3 Ligatür yerleştirilmesi.....	44
3.1.4 Lipozom hazırlanması.....	45
3.1.5 Lipozom uygulanması.....	48
3.2 Sakrifikasyon.....	49
3.3 Stereomikroskop ile Çenelerde Kemik Kaybının İncelenmesi.....	49
3.4 Histolojik İnceleme.....	49
3.4.1 Osteoblast hücresi sayımı.....	50
3.4.2 Enflamatuvar hücre sayımı.....	50
3.4.3 TRAP enzim boyaması.....	51
3.4.4 İmmünohistokimya boyaması.....	51
3.4.5 İmmünohistokimya boyama değerlendirme ve H skoru hesaplama .....	52
3.5 İstatistiksel Değerlendirme.....	52

<b>4.BULGULAR.....</b>	<b>54</b>
<b>4.1 Çenelerin Stereomikroskop Altında İncelenmesi.....</b>	<b>54</b>
<b>4.2 Histolojik Bulgular.....</b>	<b>56</b>
<b>4.3 İmmünohistokimya Sonuçları.....</b>	<b>61</b>
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....</b>	<b>67</b>
<b>6. KAYNAKLAR .....</b>	<b>80</b>
<b>7. EKLER.....</b>	<b>94</b>
<b>8. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>97</b>



## SİMGELER ve KISALTMALAR

Kisaltmalar	Açıklama
Alp	Alkaleen fosfataz
c-fms	Koloni uyarıcı faktör
COX	Siklooksijenaz
IL	İnterlökin
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentetaz
MMP	Matris metalloproteinaz
M-CSF	Makrofaj koloni uyarıcı faktör
NF-κB	Nükleer faktör Kappa Beta
NO	Nitrik oksit
OCN	Osteokalsin
OPG	Osteoprotegerin
PGE	Prostaglandin
RANK	NF-κB'nin reseptör aktivatörü
RANKL	NF-κB'nin reseptör aktivatör ligandı
TEM	Tarama Elektron Mikroskobu
TNF	Tümör nekroz faktör
TRAP	Tartrat dirençli asit fosfataz

## ŞEKİL LİSTESİ

<b><u>Şekil</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
Şekil 2.1. Periodonsiyum.....	5
Şekil 2.2. NOS enzimleri ve NO sentezi. ....	11
Şekil 2.3. Araşidonik asit metabolitleri .....	14
Şekil 2.4. Kemikte modelleme süreci .....	20
Şekil 2.5. Kemikte yeniden şekillenme süreci .....	21
Şekil 2.6. Osteoklastik farklılaşma şeması .....	25
Şekil 2.7. Periodontal sağlık ve hastalıkta sitokin ve mediatörler .....	29
Şekil 2.8. RANKL, OPG ve savunma hücreleri .....	32
Şekil 2.9. İnce film hidrasyon yöntemi ile lipozom hazırlama .....	40
Şekil 3.1. Wistar Albino Sıçan.....	44
Şekil 3.2. Lipozom hazırlama aşamalarının görüntüleri .....	45
Şekil 3.3. Lipozomların zeta potansiyeli analizi sonuçları .....	47
Şekil 3.4. Lipozomların TEM görüntüleri .....	48
Şekil 4.1. Alveol kemik kaybı ölçümleri .....	55
Şekil 4.2. Çalışma gruplarında kemik kaybı alan ve mesafe ölçümleri.....	56
Şekil 4.3. Çalışma gruplarında temsili histolojik kesit görüntüleri .....	57
Şekil 4.4. Çalışma gruplarında ortalama enflamatuvar hücre sayıları .....	58
Şekil 4.5. Çalışma gruplarında ortalama osteoblast sayıları .....	59
Şekil 4.6. Sağlıklı ve hastalıklı sıçanlarda periodontal dokular.....	60
Şekil 4.7. Çalışma gruplarında ortalama osteoklast sayıları .....	60
Şekil 4.8. Gruplarda temsili RANKL boyama görüntüleri .....	62
Şekil 4.9. Gruplarda temsili OPG boyama görüntüleri.....	63
Şekil 4.10. Çalışma gruplarında ortalama RANKL ve OPG H skorları .....	63
Şekil 4.11. Gruplarda temsili iNOS boyama görüntüleri.....	64
Şekil 4.12. Gruplarda temsili COX-2 boyama görüntüleri .....	65
Şekil 4.13. Çalışma gruplarında ortalama iNOS ve COX-2 H skorları .....	65

## ÇİZELGE LİSTESİ

### Çizelge

### Sayfa

Çizelge 4.1. Gruplarında kemik kaybı mesafe ve alan ölçümleri.....	55
Çizelge 4.2. Gruplarda enflamatuvar hücre, osteoblast ve osteoklast sayıları	61
Çizelge 4.3. Gruplarda RANKL, OPG, iNOS ve COX-2 seviyeleri.....	66



## 1. GİRİŞ

Periodontal dokular diş ve dişi destekleyen dokular olan dişeti, sement dokusu, periodontal ligament dokusu ve alveol kemik dokusundan oluşmaktadır. Periodontal açıdan sağlıklı ağızlarda bu dokularda yapı ve fonksiyon açısından herhangi bir kayıp bulunmazken, ağız hijyeni yetersiz bireylerde diş çevresinde biriken yiyecek artıkları mikrobiyal dental plak olarak birikerek bir biyofilm yapısı oluştururlar. Biyofilm içerisindeki mikroorganizmalar diş çevreleyen dişeti dokusunda enflamatuvar bir reaksiyonu başlatarak dişeti hastalığının gelişmesine yol açarlar (Armitage, G. C., 1999; Murakami ve ark., 2018). Başlayan bu enflamatuvar reaksiyon, daha fazla konak savunma hücresi ve medyatörlerinin ortamda birikmesi ile şiddetli bir enflamatuvar yanıt dönüşür ve ilk olarak dişeti dokusunda ‘gingivitis’ olarak adlandırılan doku yıkımı meydana gelir (Baker, P. J., 2000; Trombelli ve ark., 2018). Enflamatuvar yanıt durdurulmazsa yıkım periodontal ligament ve alveol kemiği de etkileyerek periodontitis olarak adlandırılan geri dönüşümsüz bir yumuşak ve sert doku yıkımı gözlenir (Armitage, G. C., 1999; Lamont ve ark., 2018; Murakami ve ark., 2018; Trombelli ve ark., 2018).

Periodontitis ağız ortamında bulunan bakteriler arasındaki dengenin bozulması ile diş çevresinde başlayan kronik bir enflamasyon ile karakterize bir hastalık olarak tanımlanmaktadır (Armitage, G. C., 1999; Armitage, G. C. ve ark., 2010). Bakterilerin başlattığı bu enfeksiyöz süreç bağışıklık sisteminin dâhil olması ve enflamasyonun şiddetlenmesi ile periodontal bağ doku ve alveol kemikte yıkım meydana getirir (Sahingur, S. E. ve Cohen, 2004a). Hastalığa yol açan bakteri biyofilmi çoğunlukla gram negatif anaerobik bakterilerden oluşur ve konakta bu bakterilere karşı ilk olarak yerel daha sonra sistemik bağışıklık yanıtı devreye girer (Baker, P. J., 2000; Cullinan ve ark., 2009; Gemmell ve ark., 1997; Genco, 1992; Okada ve Murakami, 1998).

Periodontal hastalık gelişiminde doku yapım ve yıkımı periodontal dokularda meydana gelen anabolik ve katabolik olayların bir sonucudur. Bağ dokuda fibroblast ve kemik dokusunda osteoblast aktiviteleri doku yapımını sağlar. Diğer yandan dişeti ve periodontal ligamentte enflamatuvar hücre birikimi ve pro-enflamatuvar mediatör

salınımının artması bağ doku yıkımını gerçekleştiren matriks metalloproteinaz (MMP) enzimlerinin ve kemik doku yıkımını gerçekleştiren osteoklast aktivitesinin artışına neden olur (Gemmell ve ark., 1997; Liu, Y. C. ve ark., 2010a). Periodontal dokularda meydana gelen kemik yıkımı tersinmez bir olaydır ve kaybedilen kemiği yeniden oluşturmak, farklı tedavi uygulamalarını gereksinen karmaşık bir yaklaşımdır (Assuma ve ark., 1998; Graves ve Cochran, 2003; Kobayashi ve ark., 2000; Li, L. ve ark., 2005). Bu nedenle periodontal hastalığı hastalık başlamadan önlemek, hasta ve hekim açısından mevcut hastalığı tedavi etmeye oranla daha kolay, ağrısız, invaziv olmayan ve sürdürülebilir bir yaklaşımdır.

Bu amaçla özellikle periodontal dokulardaki enflamasyonu önlemek, kollajen ve kemik yapımını arttırarak yıkımı azalmak için çok farklı uygulamalar yapılmaktadır (Demirer ve ark., 2011; Toker ve ark., 2008; Toker ve ark., 2009; Tonetti, M. S. ve Chapple, 2011). Özellikle antioksidanlar ve lipit moleküller olmak üzere birçok farklı ajan deneysel periodontitis modellerinde çalışılmış ve enflamasyonu ve kemik kaybını önledikleri gösterilmiştir (Balci ve ark., 2019; Balci Yuce ve ark., 2018; Demirer ve ark., 2011; Hatipoglu, 2011; Ozdemir ve ark., 2012; Toker ve ark., 2012). Ancak yapılan bu uygulamalarda tedavi edici veya önleyici ajan oral yoldan verilmiş ve ajanların biyoyararlanımı ile ilgili veri sağlanmamıştır. Oral yoldan alınan ajanların etkinliğini etkileyen iki önemli faktör vardır. Bunlardan ilki, ajanın kuvvetli bir asit ortamı olan mideden bozulmadan geçebilmesi ve ikincisi de ince bağırsaktan emilerek kana karışmasıdır. Birçok ajan bu aşamalardan geçerken etkinliğini kısmen veya tamamen kaybedebilmektedir. Bunun önüne geçebilmek için farklı enkapsülasyon yöntemleri tanımlanmıştır. Bunlardan en çok bilinen ve araştırılanı ise lipit enkapsülasyonu yani lipozom oluşturmaktır (Akbarzadeh ve ark., 2013; Budai ve Szogyi, 2001). Lipozom, fosfolipitlerden oluşan küresel bir veziküldür. Lipozom, kapsüllenen ajanın etkinlik süresini uzatmak veya emiliminden önce moleküler yıkımını önlemek için ilaçları veya besinleri kapsüllemek için kullanılır. En önemli avantajları, lipozomun içine yerleştirilmiş aktif maddenin korunması ve kapsüllenen ajanın kapsüllenmemiş formuna oranla daha yavaş salınarak etki süresinin uzatılmasıdır (Akbarzadeh ve ark., 2013; Lasic ve Papahadjopoulos, 1998).



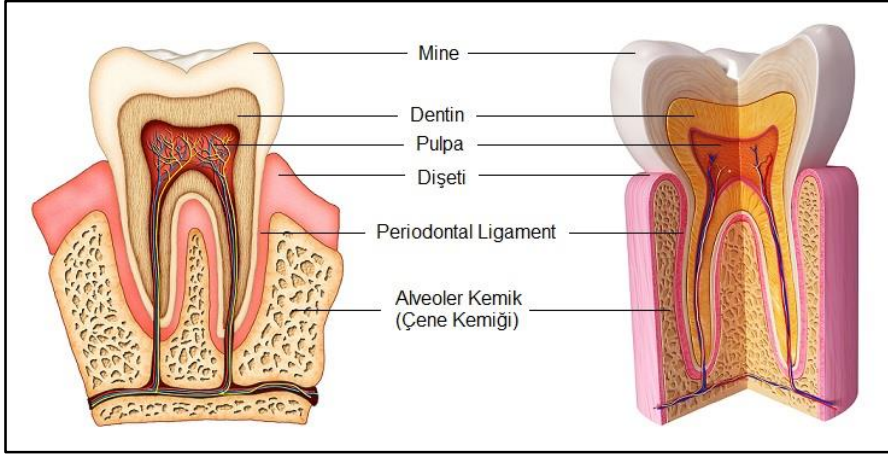
Bu doktora tez araştırmasında, gram negatif bir bakteri olan *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A.actinomycetemcomitans*, ATCC33384) suşunun sıçanlarda inokülasyon ile uygulanması ve diş çevresine ipek ligatür yerleştirilmesi ile plak birikimi sağlanarak oluşturulan deneysel periodontitiste iki farklı uçucu yağın lipozom formunun hastalığı önleyici etkisi araştırılmıştır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Periodontal Hastalıklar

Periodonsiyum sement, periodontal ligament, alveol kemik ve dişetinden oluşan diş destekleyen ve çevreleyen yapılar olarak adlandırılır (Şekil 2.1) (Nanci ve Bosshardt, 2006). Periodonsiyumu etkileyen hastalıklar, mikrobiyal plak birikimi ve bu mikrobiyal plağın konak doku cevabını uyarmasıyla başlayan kronik enflamatuvar hastalıklardır (Armitage, Gary C, 2010). Enfeksiyöz periodontal hastalıkların gingivitis ve periodontitis olmak üzere iki ana formu vardır. Gingival dokuların ve periodontal ataçman aparatının yıkımını başlatan primer etiyolojik faktör mikrobiyal dental plaktır (Armitage, G. C., 1999). Gingivitis, dental plak ve konak arasındaki etkileşim sonucunda gelişen, klinik ataçman kaybına neden olmayan, hiperemi, ödem ve kanama ile karakterize enflamatuvar dişeti hastalığıdır (Flemmig, 1999). Gingivitis, klinik ataçman kaybı veya kemik kaybı olmaksızın dişetin geri dönüşümlü iltihabi hastalığıdır. Dolayısıyla, enflamatuvar hastalığın tersinir başlangıç evresi olarak dikkate alınmaktadır (Trombelli ve ark., 2018). Periodontitis ise mikrobiyal dental biofilmdeki disbiyotik ekolojik değişikliklere bağlı olarak konak immün yanıt ve biofilm arasındaki ekolojik dengenin biofilm lehine bozulmasının sonucunda klinik ataçman kaybı, periodontal cep oluşumu, alveol kemik kaybı ve sonucunda diş kaybı ile karakterize enflamatuvar dişeti hastalığıdır (Flemmig, 1999). Periodontitiste gingivitisin ilerlemesi ve yıkıcı süreçlerin periodontal ligament ve alveol kemiğe ulaşması ile birlikte sementten kollajen liflerinin patolojik bir şekilde ayrılması, periodontal ligament ve alveol kemik kaybı ile birlikte gözlenen geri dönüşümsüz dişeti enflamasyonu ile karakterize bir durum söz konusudur (Caton ve ark., 2018).



Şekil 2.1: Periodonsiyum, Anonim, 15/12/2019

Periodontitiste bakteri ve bakteri ürünlerinin ve konak kaynaklı proteinazların diş destek dokularında kayba neden olduğu aktif ve pasif (nüks ve remisyon evrelerinin birbirini takip ettiği episodik, progresif) dönemlerin izlenebildiği kronik enflamatuvar bir durum söz konusudur (Murakami ve ark., 2018; Schätzle ve ark., 2009). Diş yüzeyinde mikrobiyal dental plak birikimi ve plağın biyofilm olarak organize olmasıyla başlayan enfeksiyöz süreç periodontal savunma ve yıkım mekanizmaları arasında dengesizliğe yol açar ve periodontal ligament dokusu ve alveol kemikte yıkım meydana gelir (Offenbacher, 1996; Sahingur, Sinem E ve Cohen, 2004b). Biyofilm yoğun olarak anaerobik bakterilerden oluşur ve bu bakteri türleri yerel ve sistemik bağışıklık ve enflamatuvar yanıtı tetikler (Page, Roy C ve Kornman, 1997a; Sanz ve ark., 2017). Bu sürecin gerçekleşmesi için bakterilere gereksinim olmasına rağmen sadece bakteri varlığı yeterli değildir ve bakterilere karşı gelişen konak yanıtının periodontal hastalıkta önemli bir rol aldığı bilinmektedir (Ramseier ve ark., 2009).

Periodontal dokularda enflamasyon, enflamatuvar hücre sayısında artış, kollajen lif miktarı ve fibroblast hücre sayısında azalma, pro-enflamatuvar sitokin salınımında artış, kompleman sisteminin aktivasyonu ve granülasyon dokusu oluşumu gibi yapısal ve biyokimyasal değişikliklere yol açar (Murakami ve ark., 2018; Offenbacher, 1996; Page, Roy C ve Kornman, 1997a). Başlayan enflamasyon diş çevresinde yumuşak dokularla sınırlı kalıp henüz alveol kemiği etkilemediğinde, hastalık gingivitis olarak

adlandırılmaktadır (Trombelli ve ark., 2018). Enflamasyonun ilerlemesi ile ataçman ve alveol kemik yıkımının oluşması ile hastalık, periodontitis olarak adlandırılmaktadır (Page, Roy C ve Kornman, 1997a; Schätzle ve ark., 2009; Tonetti, Maurizio S ve ark., 2018). Ağız ortamındaki bakteriler arasındaki dengenin bozulması ile disbiyotik mikroorganizmaların (konak içinde buldukları denge durumu bozulmuş mikroorganizmalar) başlattığı ve konak savunma sisteminin aktivasyonu ile ilerleyen enflamasyon, bazı bireysel ve/veya çevresel modifiye edici faktörlerin varlığı ile daha hızlı ve şiddetli bir yıkım seyri gösterebilir. Periodontitis teşhisinde hastalık şiddeti ve hastalığın bu modifiye edici faktörlerin varlığı ile farklı bir ilerleme seyrine sahip olması teşhiste derece ve evre olarak ifade edilmektedir (Papapanou ve ark., 2018; Tonetti, Maurizio S ve ark., 2018). Evrelendirme hastalığın şiddetine ve karmaşıklığına göre yapılır. Derecelendirme ise hastalığın hızlı ilerlemesi, beklenen tedavi yanıtı ve sistemik sağlık üzerindeki etkilerini değerlendirir (Papapanou ve ark., 2018; Tonetti, Maurizio S ve ark., 2018).

Evre 1: Başlangıç düzeyindeki periodontitis

Evre 2: Orta derecede periodontitis

Evre 3: İlave diş kaybı potansiyeli olan şiddetli periodontitis

Evre 4: Dentisyon kaybı potansiyeli olan şiddetli periodontitis

Derece A: Yavaş ilerleme

Derece B: İlimli (orta hızda) ilerleme

Derece C: Hızlı ilerleme

Disbiyotik mikroorganizmalar ve konak arasındaki etkileşim periodontal enflamasyonun ilerlemesi ve çoğalmasından sorumludur (Lamont ve ark., 2018) ve periodontal dokularda hastalık durumunda meydana gelen patolojik değişikliklerin belirlenmesi periodontitisin önlenmesinde ve tedavisinde uygulanacak yöntemlerin geliştirilmesi açısından önemlidir.

Periodontal dokularda enflamasyonun ilerlemesi belirli sinyal moleküllerinin aktivasyonu ve/veya inhibisyonuna bağlıdır ve bu sinyal molekülleri hastalık oluşum ve ilerlemesi açısından büyük öneme sahiptir (Hajishengallis ve Lambris, 2016). Hastalık oluşum ve ilerlemesinde sinyal moleküllerinin aktivasyonu artar ve enflamasyon artışı ve enflamasyonla ilişkili sinyal moleküllerinin aşırı üretilmesi, apoptoz (programlı hücre ölümü), çoğalma, farklılaşma ve hücre göçü gibi hücresele olaylarda değişiklik meydana getirir (Kurgan ve Kantarci, 2018; Venugopal ve ark., 2018).

Periodontitis, yakın zamanda evre ve derece olarak tanımlanmasından önce, etiyolojik faktörler, sistemik hastalık varlığı, hastalık prognozu ve tedavi yanıtı gibi etkenlerin dikkate alınması ile farklı bir sınıflandırmaya sahiptir.

Periodontitis, 1999 yılı Uluslararası Periodontal Hastalık ve Durumların Sınıflandırılması Çalıştayı'nda belirlenen dört başlık altında sınıflandırılmıştır:

- Kronik periodontitis,
- Agresif periodontitis ve
- Sistemik hastalıkların bulgusu olan periodontitis
- Nekrotize Ulseratif Periodontitis (Armitage, G. C., 1999).

Eski sınıflandırmaya göre kategorize edilen bu periodontitis türlerinde gözlenen katabolik olaylar, farklı hastalık durumlarında dokuda meydana gelen histopatolojik değişiklikler, tedavi sonrası gözlenen iyileşme durumları benzerlik göstermekteydi (Armitage, G. C., 1999; Page, R. C. ve Kornman, 1997b). Bu nedenle kronik ve agresif periodontitis olarak adlandırılan periodontitis türleri, etiyopatogenezlerinde çok büyük farklılıklar olmaması nedeniyle yeni sınıflandırmada tek başlık olarak periodontitis olarak isimlendirilmiştir. Eski veya yeni sınıflama sisteminden bağımsız olarak, periodontitiste gözlenen doku yıkımı episodik bir karaktere sahiptir ve periodontitis lezyonları hasta ağızında alana özgü lezyonlar değildir. Dolayısıyla periodontitis, alan-merkezli bir hastalık değil hasta-merkezli bir hastalıktır (Champagne ve ark., 2003).

### 2.1.1 Periodontitiste enflamasyon

Periodontal dokular sürekli olarak bakteri atağına maruz kalan ve bu atağa karşı yanıt geliştiren dokulardır. Periodontal dokularda sağlık durumunda, bu bakteri atağı ve hafif bir konak bağışıklık yanıtı bir denge içinde bulunur. Hem ağız ortamında yaşayan kommensal mikrobiyota hem de çiğneme işleminin neden olduğu mekanik uyarım yerel bağışıklık yanıtına destek olur ("The pathogenesis of periodontal diseases," 1999; Cullinan ve ark., 2009). Bu durumda, gingival sulkusa göç etmiş nötrofil, T hücreleri ve doğal bağışıklık hücreleri de dâhil olmak üzere, ortamda bazı yerleşik savunma hücreleri bulunur. Ancak, ağız ortamındaki bakterilerin dengesinin bozulması ve *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) veya *A. actinomycetemcomitans* gibi bazı kilit periodontopatojenlerin kolonizasyonu ile yerel mikrobiyotanın patojenitesi konağın bağışıklık yanıtını aşırı aktive etmesi periodontal dokularda yıkım sürecini başlatır. Mikrobiyota ve konak hücreleri arasındaki etkileşim ile pro-enflamatuvar sitokin kaskadı başlar, spesifik bağışıklık hücreleri üretilir, aktive olur ve farklılaşarak dişetinde birikir (Armitage, Gary C, 2010; Gemmell ve ark., 1997; Genco, 1992; Liu, Y. C. ve ark., 2010a; Okada ve Murakami, 1998).

Yerel disbiyotik mikroorganizmalara karşı patolojik konak bağışıklık yanıtı başlıca üç aşamadan oluşmaktadır. Bunlardan birincisi, mikroorganizmaların gingival epitel, dişeti fibroblastları ve dişetinde bulunan diğer savunma hücreleri ile ilk ve doğrudan temasıdır. Ayrıca dişeti dokusunda, kronik bakteri atağı maruziyeti ve çiğneme fonksiyonuna bağlı olarak, fagositik hücreler, antijen sunucu hücreler ve T hücreleri de bulunmaktadır ve gerekli olduğu durumlarda daha yüksek miktarlarda birikebilirler. Mikrobiyota ve konak hücrelerinin bu ilk etkileşimi pattern tanıma reseptörleri ve ilgili sinyal yolları aracılığı ile, içlerinde interlökin (IL)-1, IL-6 ve tümör nekroz faktör (TNF)- $\alpha$ 'nın da bulunduğu birinci dalga sitokin salınımına yol açar (Liu, Y. C. ve ark., 2010a; Offenbacher, 1996; Okada ve Murakami, 1998; Ramseier ve ark., 2009). Bu pro-enflamatuvar sitokinler lenfosit uyarımı ve doku yıkımı üzerine pleiotropik etkileri

bulunmaktadır. Mikrobiyota tarafından uyarıldıktan sonra, dişeti dokusunda bulunan fagositik, antijen sunucu ve T hücreleri tarafından spesifik lenfosit alttürlerinin farklılaşmasına yönelik ikinci dalga sitokin salınımı gerçekleşir. Birinci dalga sitokinlerin de katılımıyla spesifik hücre farklılaşmasına yönelik sinyal yolları aktive olur ve farklılaştıktan sonra olgunlaşan bu hücreler, negatif veya pozitif geri bildirim yol açabilecek olan diğer sitokinlerin salınımına neden olur. Bu sitokin-hücre etkileşimleri son derece karmaşıktır (Liu, Y. C. G. ve ark., 2010b; Pan ve ark., 2019).

### **2.1.2 İndüklenebilir nitrik oksit sentetaz (iNOS)**

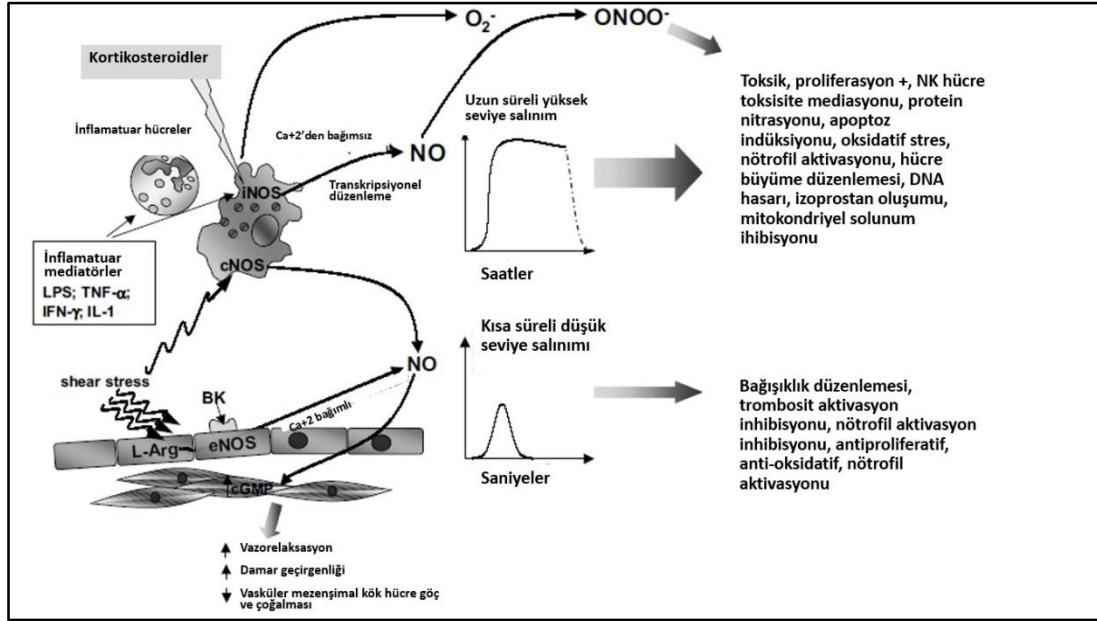
Nitrik oksit (NO) enfeksiyona karşı konak savunmasında rol oynayan bir serbest radikaldir (Guzik, T. ve ark., 2003). Nitrik oksit sentetaz (NOS) enzimleri ile L-arjininin L-sitrüline dönüştürülmesi ile NO sentezlenir. NO sentezi IL-1, gama-interferon (IFN- $\gamma$ ), TNF- $\alpha$  ile uyarılır. NO, önemli bir hücrel sinyal molekülü ve nörotransmitterdir ve anjiyogenez ve sinir gelişimi dahil olmak üzere önemli olaylarda çok farklı rolleri vardır (Coleman, 2001; Guzik, T. ve ark., 2003). NOS kalsiyum-kalmodulin kontrollü bir enzimdir ve endotelial (eNOS), nöronal (nNOS) ve indüklenebilir (iNOS) izoformları olmak üzere 3 alttürü bulunmaktadır. iNOS kalmoduline bağlanır ve bir savunma mekanizması olarak kuvvetli bir serbest radikal olan NO'yu üretir. iNOS kalsiyumdan bağımsız olarak büyük miktarlarda NO sentezi gerçekleştirebilir (Schmidt ve ark., 1992).

Oksidatif ortamlar iNOS indüksiyonuna neden olur ve yüksek oranda NO sentezi ve buna bağlı olarak peroksinitrit oluşumu gerçekleşir. Peroksinitrit süperoksit ile reaksiyona girerek makrofajların oksidatif patlamasıyla antimikrobiyal ve anti-tümör etki sağlar (Guzik, T. J. ve ark., 2002; Xie ve Nathan, 1994). eNOS ve nNOS'un aksine, iNOS aktivitesi için sadece L-arjinin varlığı yeterlidir ve pro-enflamatuvar sitokinlerle birlikte gram negatif bakterilerin lipopolisakkaritleri (LPS) iNOS ile NO sentezini yüksek oranda uyarır. iNOS, sürekli olarak çok büyük, toksik miktarlarda NO üretir ve diğer NOS'lar tarafından daha kısa sürede üretilen ve hızlı uzaklaşan NO'ya oranla iNOS tarafından üretilen NO daha toksik ve daha uzun süreli etkilidir. Nitrik oksidin

pro-enflamatuvar bir mediatör olarak etki edebileceği çok sayıda hücre içi mekanizma vardır (Salvemini ve ark., 2003). eNOS ve nNOS tarafından üretilen düşük NO seviyeleri, doğrudan pozitif yüklü metal guanilat siklaz iyonları, sitokrom p450 ve NOS'un kendisi ile etkileşime girer. Guanilat siklazın aktivasyonu, hücre içi siklik guanozin monofosfatında (cGMP) bir artışa neden olur; bu da, damar yapılarının gevşemesi, vasküler geçirgenlik artışı ve anti-proliferatif, anti-trombosit ve anti-oksidan etkileri içeren NO eylemlerine aracılık eden cGMP'ye bağımlı protein kinazları aktive eder ve T helper hücre proliferasyonu ve sitokin salınımı düzenlenmesinde rol oynar (Coleman, 2001; Guzik, T. ve ark., 2003).

iNOS'un ürettiği NO'nun fonksiyonları diğer izoformların ürettiklerinden oldukça farklıdır. iNOS uyarılmış makrofajların aşırı miktarda NO sentezlemesine neden olur. Sentezlenen bu NO saniyeler içinde nitrit veya nitrate oksitlenir ve mikroorganizmaları öldürerek makromoleküllerin nitrozillenmesine yol açar. Miyeloit hücrelerden büyük miktarda üretilen enflamatuvar NO'ya genellikle büyük miktarda süperoksit anyonu (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) üretimi eşlik eder (Guzik, T. J. ve ark., 2002; Salvemini ve ark., 2003). Süperoksit ve NO birleşerek peroksinitriti oluşturur ve DNA hasarı, yüksek yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidasyonu, izoprostan oluşumu, tirozin nitrasyonu, akonitaz ve mitokondriyal solunumun inhibisyonu gibi sitotoksik etkiler gözlenir (Guzik, T. J. ve ark., 2002; Salvemini ve ark., 2003). Bu reaksiyonun süperoksit dismutaz (SOD) ile önlenmesi enflamasyonu başarılı bir biçimde sınırlandırmıştır. NO özellikle septik şok gelişmesinde büyük rol oynar. Septisemi sırasında iNOS'un yüksek oranda NO sentezlemesi arteriyel hipotansiyon, vazopleji, laktik asidoz, nekroz ve apoptoza yol açar. Buna rağmen NO, makrofajların antimikrobiyal fonksiyonlarının büyük kısmından sorumludur (Coleman, 2001; Guzik, T. J. ve ark., 2002). iNOS ve NO üretimi Şekil 2.2'de gösterilmiştir.





Şekil 2.2: NOS enzimleri ve NO sentezi. Guzik ve ark.'nın makalesinden Türkçe'leştirilmiştir (Guzik, T. ve ark., 2003).

### 2.1.3 Siklooksijenaz (COX)-2

COX, araşidonik asitten prostasiklin gibi prostaglandinleri ve tromboksanı içeren prostanoitleri oluşturan membrana bağlı bir enzimdir. Aynı zamanda prostaglandin-endoperoksidaz sentaz olarak da adlandırılmaktadır. COX-1 ve COX-2 olmak üzere benzer molekül ağırlığına sahip iki izozimi bulunmaktadır (Marnett ve ark., 1999). Araşidonik asit hücre membranı fosfolipitlerinde bulunan ve diyetle de alınabilen çoklu doymamış bağlara sahip bir omega-6 yağ asitidir. Araşidonik asitten türetilen ilk metabolitler olan prostaglandinler, bazı temel fizyolojik fonksiyonlara aracılık eder. Prostaglandinlerin oluşumu, araşidonik asidin fosfolipaz A2 enzimi ile hücre membranından serbestleşmesi ile başlar ve araşidonik asit kaskadı olarak da ifade edilen araşidonik asit metabolitleri reaksiyonlar zincirinin oluşması için en az iki ayrı enzimatik yol tanımlanmıştır. Bunlardan birincisi, COX'un prostaglandin ve tromboksan oluşumunu başlatmasıdır. Bu yollardan ikincisi ise 5-lipooksijenazın aracılık ettiği araşidonik asidin lökotrienlere dönüştürülmesidir. Lökotrienler bronkonstrüksiyon, damar geçirgenliğinin artması, lökosit adezyonu, lökosit göçü ve

ödem gibi enflamatuvar yanıtlar için güçlü bir mediatördür (Innes ve Calder, 2018; Marnett ve ark., 1999; Morita, 2002; Patrignani ve ark., 2005).

Hücre zarı fosfolipitlerinin yağ asiti içeriği uyarılara karşı hücre cevabı ve hücre fonksiyonlarında önemli rol oynamaktadır. Diaçilgliseroller, endokannabinoidler ve trombosit aktive edici faktör gibi birçok ikincil mesajcı molekül membran fosfolipitlerinden türetilir. Bazı lipit medyatörler de hücrel aktivasyon sonrasında membran fosfolipitlerinden salınan yağ asitlerinden oluşur. Bunların başlıca örneği ise araşidonik asitten üretilen eikosanoitlerdir (Innes ve Calder, 2018; Tapiero ve ark., 2002). Yağ asitleri lipit medyatörler, ikincil haberci moleküller ve membrandaki dizilimleri aracılığıyla hücre içi ve hücre dışı sinyal iletiminde önemli role sahiptir ve enflamatuvar yanıt başta olmak üzere farklı doku ve organlarda fizyolojik ve metabolik reaksiyonları etkilerler (Innes ve Calder, 2018; Marnett ve ark., 1999; Tapiero ve ark., 2002).

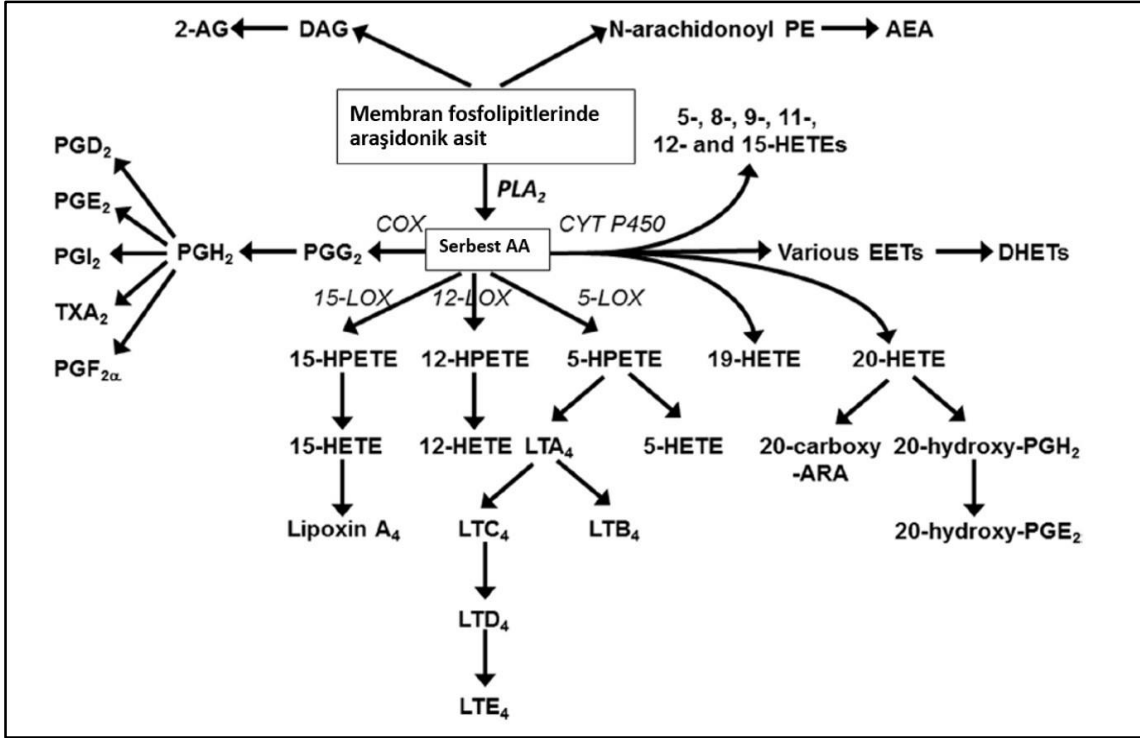
Prostanoitler, hedef hücrelerin yüzeyindeki membran reseptörleri aracılığıyla çok çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçleri düzenleyen lipit medyatörleridir. Fizyolojik koşullar altında, prostanoitler gastrik mukozanın korunması, hemostaz ve renal fonksiyonlarda önemli rol oynarlar. Enflamasyon gibi patolojik durumlarda ise prostanoit biyosentezi, indüklenir ve çeşitli uyarılarla araşidonik asit membranda bulunan fosfolipitlerden ayrılır (Marnett ve ark., 1999; Morita, 2002). COX enzimleri bu reaksiyondan sorumlu olan enzimlerdir. COX-1 birçok hücre ve dokuda, fizyolojik veya patolojik koşullardan etkilenmeksizin, sürekli olarak eksprese edilir ve temel olarak vücuttaki homeostatik fonksiyonların düzenlenmesinde rol alan prostaglandinlerin sentezini kontrol eder. COX-2 ise fizyolojik koşullarda birçok hücrede bulunmaz ve enflamatuvar bir uyarana yanıt olarak bazı hücrelerde yüksek oranda prostaglandin salınımı gerçekleştirir (Ghosh ve ark., 2010; Morita, 2002; Simon, 1999; Willoughby ve ark., 2000).

Fizyolojik koşullarda sağlıklı hücrelerde, COX-2 fosfolipazlar ve COX-2 geninin aktivasyonu ile endojen olarak üretilen çok düşük miktardaki bir araşidonik asitten prostanoit üretir. Pro-enflamatuvar sitokin ve büyüme faktörlerinin çoğu fosfolipaz ve

COX-2 gen aktivitesini indükler ve glukokortikoidler her iki aktivasyonu da önleyerek COX-2 aktivitesini ve prostaglandin üretimini sınırlandırır. COX-1 ise sadece yüksek araşidonik asit miktarlarında (dışardan araşidonik asit alımı gibi) fonksiyon görebilir (Marnett ve ark., 1999; Patrignani ve ark., 2005).

COX-2'nin oluşturduğu prostaglandinler başlıca ağrı ve enflamasyon ile ilişkili reaksiyonlara aracılık ederler (Simon, 1999; Willoughby ve ark., 2000). COX-2'nin normal dokuda çok az bulunmasına rağmen, özefagus, mide, akciğer, meme, kolorektal ve epitelyal kanserlerde çok miktarda bulunduğu gösterilmiştir (Ghosh ve ark., 2010). COX-2 indüksiyonu enflamatuvar sitokinler, büyüme faktörleri, hipoksi, tümör promotörleri gibi farklı uyaranlardan etkilenir (Innes ve Calder, 2018; Morita, 2002; Patrignani ve ark., 2005; Tapiero ve ark., 2002). Dışarıdan araşidonik asit alımı da hücre içi serbest araşidonik asit seviyesini etkileyerek araşidonik asit metabolizmasını etkiler ve hücre ve dokularda oksidatif strese yol açabilir (Tapiero ve ark., 2002).

COX-2 geni özellikle IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  ve LPS tarafından büyük ölçüde indüklenir ve COX-2 aktivitesi ve prostaglandin sentezi artar (Dinarello, 2000; Simon, 1999; Willoughby ve ark., 2000). Bundan dolayı, COX-2 osteoartrit, romatoid artrit ve kas-iskelet sistemi ağrısı gibi ağrı ve enflamasyonla ilişkili hastalık ve durumlar için hedef bir gen olmuştur. Bu sitokinler aynı zamanda membrana bağlı prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) sentazı da indükleyerek pozitif bir geri bildirim sağlarlar. Enflamasyon durumunda COX-2 ve mPGE<sub>2</sub> sentazın koaktivasyonu enflamatuvar sürecin şiddetlenmesine yol açar (Dinarello, 2000; Innes ve Calder, 2018; Morita, 2002; Patrignani ve ark., 2005; Simon, 1999; Willoughby ve ark., 2000). Araşidonik asit metabolizması ürünleri Şekil 2.3'te gösterilmiştir.



Şekil 2.3: Araşidonik asit metabolitleri. AA: araşidonik asit. Innes ve ark.'nın makalesinden Türkçe'leştirilmiştir (Innes ve Calder, 2018).

## 2.2 Kemik Dokusu

### 2.2.1 İskelet sistemi ve kemik dokusu

Kemik iskeleti, vücudun yapısal desteğini ve hareket yeteneğini sağlayan aynı zamanda vücudu koruyan önemli bir organdır. Ayrıca, iskelet sistemi temel mineraller için bir depo işlevi de bulunmaktadır. Sürekli olarak kendini yenileyen bir metabolizmaya sahiptir. İskeletin yapısı, kuvvetli fiziksel aktivite sırasında kemiğe gelen yüke maruz kaldığında kırılmayacak şekilde yeterli güç ve hareketlilik sağlayacak şekilde oluşmuştur. Kemiğin şekli veya yapısı, en azından bu mukavemeti sağlamadaki kütlesi kadar önemlidir (General, 2004; Saladin, 2004).

İskelet sistemi farklı fonksiyonel bileşenlerden oluşur ve bu bileşenlerin en önemlisi kemik dokusudur. Kemik dokusunun fonksiyonel kısmı, kemik matrisi, hücrelerarası bir

matristir ve protein ve mineral içerir. Proteinler, kemiğin organik matrisini oluştururken mineraller kemiğin inorganik yapısını oluştururlar. Kemik yapımı sırasında ilk olarak organik matris sentezlenir ve daha sonra bu matrise mineral eklenir. Organik matrisin büyük çoğunluğu kollajenden oluşur ve mineral olarak hidroksiapatit birikmesiyle organik matris mineralleştirilir. Kollajen ve hidroksiapatit kompozit bir yapıya sahiptir ve kemiğin kuvvetlere karşı hasara uğramadan mukavemetini sağlar (Buckley ve ark., 1998).

Kemik dokusu aynı zamanda, diğer vücut sistemlerinin işleyişi için gerekli olan kalsiyum ve fosfor için bir depodur ve bu minerallerin kandaki seviyeleri kemik dokusu aracılığı ile kontrol altında tutulur. Kandaki sabit bir kalsiyum seviyesinin korunması ve hücrelerde yeterli miktarda kalsiyum ve fosfor sağlanması, tüm vücut organlarının işlevi için, özellikle de sinirler ve kas için çok önemlidir (Lima ve ark., 2001; Tsevis ve ark., 2018). Bu nedenle, kalsiyum ve fosfor metabolizmasının düzenlenmesi için vücutta karmaşık bir düzenleyici hormon sistemi gelişmiştir. Bu hormonlar sadece kemik üzerinde değil, bağırsak ve böbrek gibi diğer dokularda da bu elementlerin elde edilmesini düzenlerler. Dolayısıyla kemik sağlığının sürdürülmesinin zor olmasının bir nedeni de iskeletin aynı anda birbiriyle rekabet halinde olan iki farklı fonksiyona sahip olmasıdır. İlk olarak, kemik mekanik yükleme veya ağırlık kaldırmadaki değişikliklere yanıt vermelidir ki bu değişiklikler bol miktarda kalsiyum ve fosfor kaynağına ihtiyaç duyan güçlü kemikler gerektirir. Eğer bu elementler yetersiz alınmışsa, düzenleyici hormonlar vücudun diğer sistemlerinde hayati işlevlerin devam edebilmesi için kemikten bu elementleri çıkarır ve kana geçirir. Ancak uzun süreli ve şiddetli mineral alım yetersizliği kemikteki kalsiyum ve fosfor miktarını azaltarak kemiği zayıflatır ve kırıklara yol açabilir (Buckley ve ark., 1998; General, 2004; Saladin, 2004).

Kemik miktarı, yapısı veya şekli genellikle genetik olarak belirlenmiş olmasına rağmen bir ölçüde mekanik kuvvetler tarafından da şekillendirilebilir. Mekanik kuvvetler, kemik dokusunun büyüme ve gelişimi için gerekli uyarımı sağlar ve kemik homeostazı için bu uyarımlar gereklidir. Dolayısıyla, kemik kütle, yapı ve şekli kemiğin maruz kaldığı mekanik kuvvetler değiştikçe değişim gösterecektir ve mekanik uyarımın

olmaması kemik dokusunda atrofi ve zayıflığa yol açar (Müller ve Rügsegger, 1996). Kalsiyum ve fosfor metabolizmasındaki rolü ve iskelet sisteminde meydana gelen küçük hasarların onarımı için kemik dokusu hayat boyu bir şekillenme sürecine maruz kalmaktadır. Eski kemik parçalanır ve sürekli olarak yeni kemik oluşur. Kemik dokusunun fizyolojisi internal ve eksternal, mekanik ve hormonal, yerel ve sistemik olmak üzere çok farklı uyarana cevap vermekte ve çok farklı sistemlerin ve sinyal moleküllerinin düzenlemesine tabi olmaktadır (Lanyon ve ark., 1982).

Kemiğin organik ve inorganik yapısının kendine özgü kompozit yapısı, kemik dokusuna kuvvet altına elastikiyet ve dayanıklılık sağlar. Kemik kollajeni gelen kuvvetlerin emilerek hasara yol açmamasını sağlarken, hidroksiapatit kemiğe dayanıklılık sağlar (Fonseca ve ark., 2014; Weiner ve Wagner, 1998). Kollajen, kemik hücreleri tarafından yapılır ve daha sonra aralarında kimyasal bağlantılar ile güçlendirilmiş daha büyük lifler halinde birleştirilen üç iç içe protein zincirini içeren uzun ince çubuklar halinde bir araya getirilir. Kemikteki diğer proteinler, kollajen matrisini daha da güçlendirmeye ve mineral bağlama yeteneğini düzenlemeye yardımcı olabilir. Kemiğin şeklindeki çok küçük değişiklikler, iskelet içindeki mekanik hareketlere tepki veren kimyasal sinyaller üreten kemik hücrelerinde (osteositler) etki yaratır (Müller, 2009).

Kemik dokusu dışta kortikal kemik ve içte trabekül olarak adlandırılan iki farklı tabakadan oluşmaktadır. Kortikal tabaka iskelet sisteminin büyük çoğunluğunu oluştururken trabeküler tabaka daha az bir kısmını oluşturmaktadır. Kemiklerin şekli, kortikal tabakanın şeklini alır ve kortikal tabaka kas ve tendonların tutunmasını sağlar ve trabeküler tabaka da iskeletin dayanıklılık ve bütünlüğünü sağlarken aynı zamanda da kalsiyum ve fosfor dengesinin sağlandığı bölgelerdir. Hem kortikal hem trabeküler kemiğin şekli ve boyutu, fiziksel aktivite tarafından üretilen farklı stres türlerine cevap verebilir (Buckwalter ve Cooper, 1987).

## 2.2.2 Kemik yapımı ve mineralizasyon

Kemik oluşumu intramembranöz ve endokondral olmak üzere iki farklı yolla gerçekleşir. Bunlardan intramembranöz kemikleşme kemik dokusunun doğrudan mezenşimal dokudan oluşmasıyla, endokondral kemikleşme kemik dokusunun kıkırdak dokusundan oluşmasıdır. Kemik oluşumu için osteoblast farklılaşması gereklidir. Osteoblast farklılaşması sırasında, progenitör hücreler farklı düzenleyici transkripsiyon faktörlerini eksprese eder. Osteoprogenitor hücreler, büyüme faktörlerinin etkisi altında mineral çökeltme bölgesine yüksek konsantrasyonlarda fosfat sağlayan temel bir enzim olan alkalen fosfataz (Alp) varlığında osteoblastları oluştururlar ve mineralizasyonu başlatırlar (Hill, 1998; Lanyon ve ark., 1982; Müller, 2009; Müller ve Rügsegger, 1996; Weiner ve Wagner, 1998).

Osteoblastlar kemiği hücre dışı sıvıdan sıkı bağlantılar (tight junction) aracılığıyla, düzenlenmiş transport ile ayrı tutarlar. Kıkırdaktan farklı olarak, fosfat ve kalsiyum pasif difüzyon ile içeri veya dışarı hareket edemez, çünkü sıkı osteoblast bağlantıları kemik oluşum alanını izole eder. Kalsiyum, osteoblastlar boyunca kolay transport ile (bir gradyana karşı kalsiyumu pompalamayan pasif taşıyıcılar) taşınır. Tersine, fosfat aktif olarak taşınır. ATP dâhil olmak üzere fosfat içeren bileşikler üretilir ve bu bileşiklerdeki fosfat, mineralizasyon alanında yüksek bir fosfat konsantrasyonu oluşturmak için Alp ile koparılır. Alp, aktif osteoblastların apikal (sekretuar) yüzünde büyük miktarlarda eksprese edilen karakteristik bir işaretleyici olan bir membrana bağlı proteindir (Balcerzak ve ark., 2003; Hill, 1998; Lanyon ve ark., 1982; Müller ve Rügsegger, 1996; Tsevis ve ark., 2018). Kemik mineralinin stokiyometrisi (hangi bileşenin ne kadar gerektiği ve bu bileşenlerden ne kadar bileşik elde edileceğinin oranı) temel olarak hafif alkali pH'ta fosfat, kalsiyum ve sudan oluşan hidroksiapatittir. Hidroksiapatit ise şu formüle sahiptir  $6 \text{HPO}_4^{-2} + 2 \text{H}_2\text{O} + 10 \text{Ca}^{+2} \rightleftharpoons \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 + 8 \text{H}^+$  (Buckley ve ark., 1998; Buckwalter ve Cooper, 1987; Saladin, 2004). Kemik yıkımında, hidroksiapatitin mineral çözeltisine dönüştürülmesi için tersine bir taşıma mekanizması ile asit kemik matriksine taşınır.

Kemik yapım ve yıkımında osteosit hücrelerinin önemli bir görevi bulunmaktadır. Kemik oluşumunun durması gerektiğinde veya kemikten kana mineral geçişi gerekli olduğunda osteositler sklerostin adı verilen bir molekül sentezler. Sklerostin, glikoprotein yapısında bir kemik morfogenetik protein (BMP) antagonistidir. Kemik yapımını sağlayan sinyal yolağını engelleyerek kemik yapımını durdurur (Winkler ve ark., 2003). Sklerostin yapımı paratiroid hormon (PTH), mekanik uyarımlar ve PGE<sub>2</sub> gibi sitokinler tarafından azaltılır ve kalsitonin tarafından artırılır (Winkler ve ark., 2003).

### **2.2.3 Kollajen ve kemik dokusu proteinleri**

Kemiğin organik bileşenlerinin büyük çoğunluğu çapraz bağlı tip 1 kollajenden oluşmaktadır. Diğer organik bileşenler ise osteokalsin, osteonektin, kemik sialoprotein ve alkalin fosfatazdır. Kollajen sentezi kemiğin uzun eksenine paralel katmanlar ve sonrasında kemiğin uzun eksenine dik katmanlar halinde, her biri birkaç mikrometre kalınlığı geçmeyen katmanlar, gerçekleşir. Kemiğin organik bulunan proteinlerin en önemlileri osteokalsin ve osteopontindir. Osteokalsin kemik yapımı sırasında sentezlenir ve kemik ve dentin dokusunda bulunur, başka dokularda sentezlenmez. Bu nedenle kemik yapım sürecinin bir göstergesidir. Karboksilli ve karboksilsiz olmak üzere iki şekilde bulunur. Karboksilli formu kemikteki kalsiyuma bağlanır ve kemikte birikir. Karboksilsiz formunun ise pankreas, yağ ve kas dokusu gibi farklı dokularda etki gösteren bir hormon işlevi bulunmaktadır (Karsenty ve Olson, 2016). Osteopontin ise kemik sialoprotein 1 olarak da bilinir ve aşırı negatif yüklü çok fonksiyonlu bir proteindir. Özellikle negatif yükü nedeniyle kalsiyuma çok hızlı bağlanarak mineralizasyon inhibitörü olarak görev yapar. Osteoklastların kemik yıkımını gerçekleştirdikleri fırçamsı kenar oluşturmalarına ve kemiğe tutunmalarına aracılık ettiği bilinmektedir. Ayrıca kemotaksis, protein adhezyonu, hücre tutunması ve sitokin salınımı gibi fonksiyonları öne sürülmüştür (Icer ve Gezmen-Karadag, 2018). Osteonektin ise, kemik mineralizasyonunda, hücre-matriks etkileşimlerinde ve kollajen bağlanmasında rol oynayan asidik bir hücre dışı matriks glikoproteinidir. Kemik içinde matriks metalloproteinazlarının üretimini ve aktivitesini de artırır. Fonksiyonları

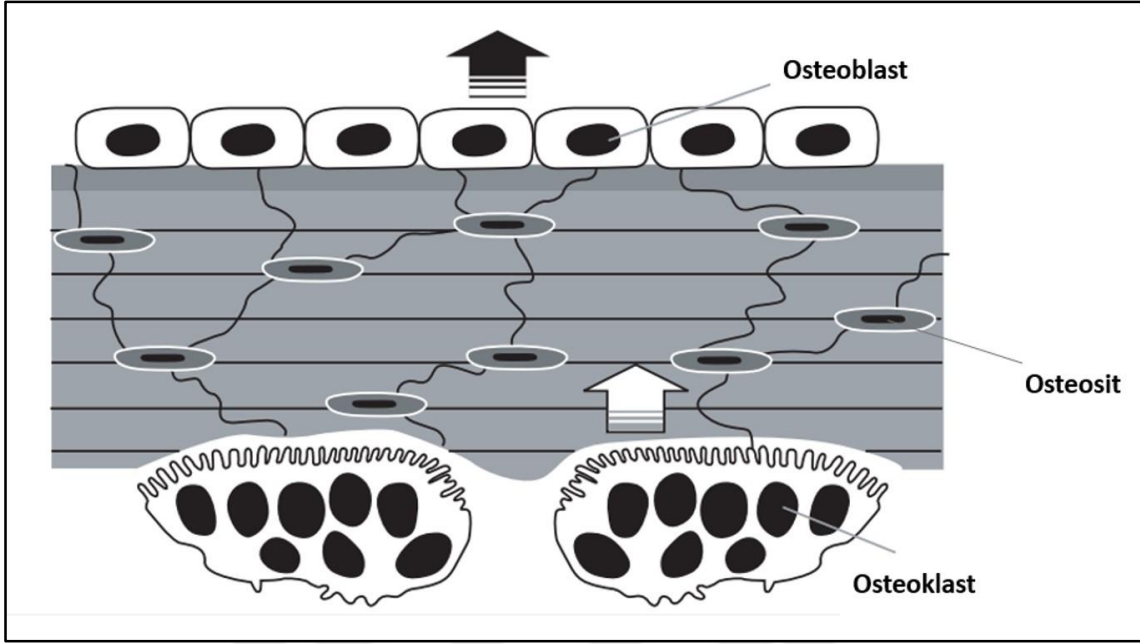


arasında anjiyogenez, hücre çoğalması ve göçü de yer almaktadır. Osteonektinin aşırı ekspresyonu, meme, prostat ve kolon gibi birçok insan kanserinde gösterilmiştir (Bradshaw, 2012; Rosset ve Bradshaw, 2016).

#### **2.2.4 Kemik dokusunda modelleme ve yeniden şekillenme (modelling and remodelling)**

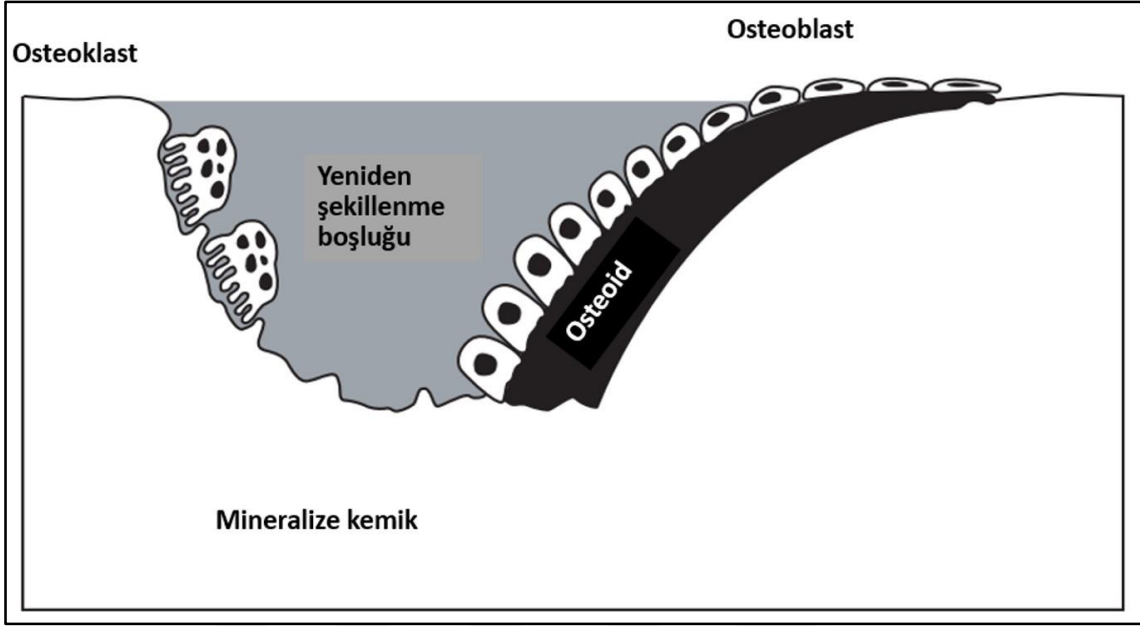
Yaşam boyunca kemikler boyut, şekil ve pozisyon olarak sürekli bir değişim içindedir. Bu değişim iki süreç tarafından oluşturulur. Bunlar kemik modellemesi ve yeniden şekillenme süreçleridir. Kemğin bir bölgesinde yeni bir kemik oluştuğunda ve farklı bir bölgesinde kemik parçalandığında oluşan bu kemğin şekil ve pozisyonunu değiştiren süreç modelleme sürecidir. Ayrıca, kemik dokusunda aynı bölgede hücrel olarak yıkım ve yenilenme meydana gelmektedir. Bu süreç de yeniden şekillenme olarak adlandırılmaktadır. Modellemede, osteoblast ve osteoklast aktiviteleri bağlantılı değildir ve kemğin miktarı, şekli ve pozisyonunda hızlı değişiklikler meydana gelebilir. Yeniden şekillenmede ise, osteoblast aktivitesi öncesinde oluşan osteoklast aktivitesine bağlıdır ve bu iki olay birbirini takip eder (Hill, 1998; Lanyon ve ark., 1982).

Yaşamın erken dönemlerinde kemikler modelleme ile şekillenir ve boyut olarak büyüyerek 3 boyutlu olarak yer değiştirmesine olanak tanır (Seeman, 2003). Çocukluk döneminde kemikler büyür ve gelişir, çünkü kemikte rezorpsiyon oluşur ve dış (periosteal) yüzeyinde yeni kemik oluşumu gerçekleşir (Şekil 2.4). Ergenlikte ise kemikler kalınlaşır, çünkü hem dış hem de iç (endosteal) yüzeylerde kemik oluşumu oluşabilir. Yaşamın ilerleyen dönemlerinde ise iç yüzeylerde kemik yıkımı, dış yüzeylerde kemik oluşumu meydana gelir. Bu yeniden şekillenme süreci yaşam boyunca devam eder ve kemik gelişimi zirveye ulaştığında (20'li yaşlar), kemik dokusunda görülen baskın süreç yeniden şekillenme olur. Yeniden şekillenmede, trabekülün yüzeyinde veya korteksin iç kısmında az miktarda kemik rezorbe olur ve daha sonra aynı yerde yeni kemik oluşturulur (Şekil 2.5). Kemik şekli yeniden şekillenme sürecinde değişmez. Bu süreç, kemiklerin yaşam boyunca yenilenmesini sağlar, kemikteki küçük hasarları giderir ve kalsiyum fosfor metabolizmasını düzenler.



Şekil 2.4: Kemikte modelleme süreci. Rauch ve ark.'nın makalesinden Türkçe'leştirilmiştir (Rauch ve Glorieux, 2004).

Modelleme ve yeniden şekillenme iskeletin yaşamın her 10 yılında bir yenilenmesine olanak veren ve yaşam boyunca devam süreçlerdir. Modelleme yetişkinlikte daha az oluşmasına rağmen kemiğin zayıfladığı bazı durumlarda yeniden şekillenme ile birlikte oluşabilir. Böylece yaşlanmayla birlikte, içeride aşırı miktarda kemik kaybı olursa, dışarıdan bir miktar yeni kemik oluşturulabilir ve böylece kemik kütesinin kaybına rağmen kemiğin mekanik dayanıklılığı korunabilir (General, 2004; Hill, 1998; Lanyon ve ark., 1982; Lima ve ark., 2001).



Şekil 2.5: Kemikte yeniden şekillenme süreci. Rauch ve ark.'nın makalesinden Türkçe'leştirilmiştir (Rauch ve Glorieux, 2004).

Modelleme ve yeniden şekillenme kemik dokusu hücrelerinin gerçekleştirdiği olaylardır. Bu hücreler, kemik yapımından sorumlu olan osteoblast hücreleri ile kemik yıkımından sorumlu olan osteoklast hücreleridir.

### 2.2.5 Osteoblast hücreleri

Kemik dokusu, hem organik ve hem inorganik içeriği, osteoblast adı verilen yapısal hücreler tarafından sentezlenir. Osteoblastlar, tek çekirdeğe sahip hücrelerdir ve kemik oluşumu osteoblastların gevşek bağlantı (gap junction) ile birbirine bağlı olarak bir grup halinde çalışmalarını gerektirir. Bireysel hücreler kemik sentezi yapamaz ve grup halindeki osteoblastların organize olarak sentezlediği kemik osteon olarak adlandırılır. Osteon, en küçük temel fonksiyonel kemik ünitesidir bir milimetreden küçük çapta, birkaç milimetre uzunlukta silindirik yapıdadırlar. Osteonlar, osteoblastlardan sıkı bağlantılar aracılığı ayrı bulunurlar. Sıkı bağlantılar kemik yapım bölgesini eski kemikten ayrı tutar ve bireysel osteoblastların hücre dışı sıvı geçişini önleyerek hücre dışı sıvıdan ayrı bir kemik bölmesi oluştururlar. Gevşek bağlantılar ise osteoblastların toplu olarak fonksiyon görmesine olanak tanır. Gevşek bağlantılar, osteositleri

osteoblastlara bağlayan bağlantılardır (Buckley ve ark., 1998; Buckwalter ve Cooper, 1987; Fonseca ve ark., 2014; Müller, 2009; Müller ve Rügsegger, 1996; Saladin, 2004; Weiner ve Wagner, 1998).

Osteoblast hücreleri mezenşimal kök hücrelerden köken alırlar ve bu hücrelerden en son farklılaşmış hücre tipidir. Bu mezenşimal hücreler, kas, yağ, kıkırdak veya kemik hücrelerine farklılaşabilen öncül hücrelerdir. Doğru koşullar altında bu hücreler farklılaşarak yeni kemik oluşturmak için iskeleyi ya da kemik matrisini oluşturan kollajeni üreten osteoblast hücrelerine dönüşürler. Kemiklerin organik matrisini oluşturan osteokalsin ve osteopontin dâhil olmak üzere çok daha küçük miktarlarda yoğun, çapraz bağlı kolajen ve özel proteinleri sentezlerler ve periostta, kemiklerin dış yüzeyindeki ince bağ dokusu tabakasında ve endosteumda çok sayıda bulunurlar (Buckley ve ark., 1998; Buckwalter ve Cooper, 1987; Seeman, 2003).

Kemik yapımı sırasında mineralize olmamış matrise osteoit denir ve osteoit sentezleyen osteoblastlar kübik şekilli, yuvarlak ve büyük bir çekirdeğe sahip, kemik yüzeyinde bulunan hücrelerdir. Aktif olarak kemik sentezi yapmayan osteoblastlar yassılaşıp, çekirdekleri yuvarlaklığını yitirerek küçülür ve bu hücreler astar hücreleri veya inaktif osteoblastlar (surface lining cells) olarak adlandırılırlar (General, 2004; Rauch ve Glorieux, 2004; Saladin, 2004). Sentezlenen kemiğin içine gömülü kalan osteoblast hücreleri ise osteosit hücreleri olarak adlandırılır ve kemik dokusunun en çok sayıda bulunan hücreleri bu hücrelerdir. Osteositler ve osteoblastlar ince uzun hücresel bağlantılar ile birbirlerine ve yüzeydeki osteoblastlara bağlıdırlar. Osteositlerin en önemli görevi, kalsiyum ve fosfat metabolizmasını düzenlemek için kemik yıkımını başlatmaktır. Osteositlerin oluşturduğu hücresel bu ağ, kemiğin mekanik kuvvetlere ve yaralanmaya cevap verebilmesi için kritik öneme sahiptir. Kemik dokusu kuvvetli bir mekanik uyarana maruz kaldığında osteosit hücrelerinin hücresel uzantıları çevresinde bir sıvı hareketi oluşur. Sıvı hareketi sonrasında osteosit hücresi yüzeydeki hücrelere kemik yapım veya yıkımının oluşmasına yönelik sinyal gönderir ve kemik dokusu uyarana cevap olarak yapım veya yıkıma uğrar (General, 2004; Lima ve ark., 2001; Müller ve

Rüeggsegger, 1996; Winkler ve ark., 2003). Kemik oluşum sürecinde mineralize olmamış matris kalsiyum ve fosfat eklenerek osteoidin mineralize olması sağlanır.

### 2.2.6 Osteoklast hücreleri

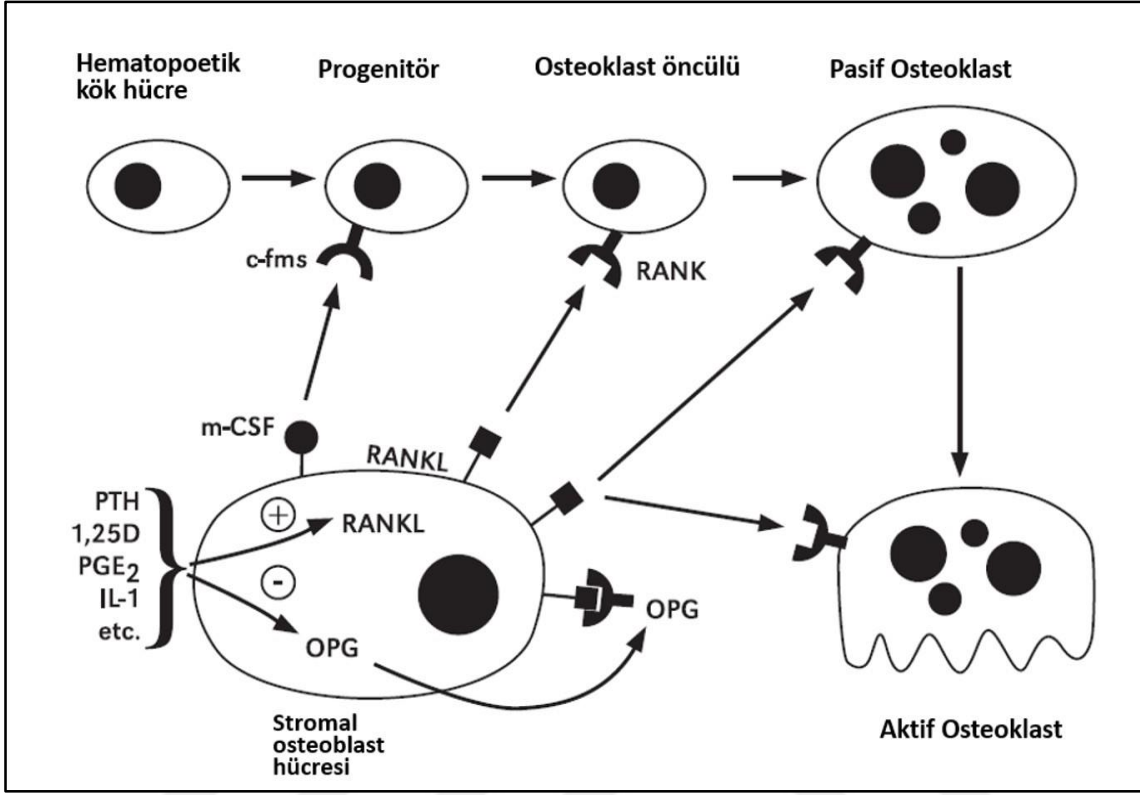
Osteoklastlar osteoblastlara oranla farklı hücre grubundan köken alan, mitokondri ve lizozomdan zengin, çok çekirdekli ve yaklaşık olarak 100-200 mikrometre çapında büyük hücrelerdir. Genellikle dev hücre olarak adlandırılırlar (Basle ve ark., 1988). Kemiğin dış yüzeyinde, periost tabakasının hemen altında bulunurlar ve osteona bağlanmaları kemik yıkım sürecini başlatır. Osteoklastojenezi indükleyen sitokin ve medyatörler, monosit-makrofaj hücrelerini osteoklast benzeri dev hücreye dönüştürebilir fakat bu hücreler canlı kemik dokusunda bulunan ve kemik yıkımını gerçekleştiren osteoklastlardan önemli farklılıklar gösterir (Vignery, 2000).

Osteoklastlar kemik yüzeyinde oluşturdukları rezorpsiyon çukurları (Hawship lakünaları) içinde bulunurlar ve sitoplazmaları içerdikleri çok sayıda asit fosfataz içeren lizozomları içeren vakuol ve kesecik nedeniyle köpüğümsü bir görünüme sahiptir (Basle ve ark., 1988). Osteoklastlar, kemiğin organik ve inorganik matrisini parçalayan tartrat dirençli asit fosfataz (TRAP) ve katepsin K gibi enzimlere sahiptir ve diğer hücrelerden farklı olarak endoplazmik retikulumdan fakir golgi kompleksinden zengin bir hücresel yapıları vardır (Boyle ve ark., 2003). Osteoklastın kemik yıkımı, kemiğe komşu hücre yüzeyindeki fırçamsı çıkıntılar (ruffled border veya fırçamsı kenar) aracılığı ile gerçekleşir. Fırçamsı kenar, osteoklastta daha hızlı enzim salınımı, yüzey alanında artış ve enzimin daha hızlı geri emilimi gibi avantajlar sağlar. Aktif osteoklastlar fırçamsı kenar görüntüleri ile ayırt edilebilirler ve bu kenar görüntüsü aktif osteoklastta özgü bir morfolojik görüntüdür (Boyle ve ark., 2003; Teitelbaum, 2000).

Osteoklastlar, monosit fagositik sistem hücrelerinden köken alan ve farklılaşmaları için özel iki medyatöre ihtiyaç duyan son derece özelleşmiş hücrelerdir. Bu faktörlerden ilki nükleer faktör  $\kappa$ B ligandının reseptör aktivatörüdür (RANKL). Diğeri ise makrofaj koloni stimulan faktördür (M-CSF) (Boyle ve ark., 2003). M-CSF monositlerin,

makrofajların ve kemik iliği progenitör hücrelerinin proliferasyonunda, farklılaşmasında ve sağ kalımında rol oynayan hematopoetik bir büyüme faktörüdür. M-CSF osteoklast üzerindeki reseptörü olan c-fms (koloni uyarıcı faktör 1 reseptörü) aracılığıyla aktivite gösterir ve hematopoetik progenitörlerin çoğalmasını düzenler ve bağışıklık, metabolik faaliyetler, doğurganlık gibi çok farklı biyolojik olaylarda çok sayıda fizyolojik süreci etkiler (Ross, 2006). C-fms bir transmembran tirozin kinaz-reseptörüdür ve tirozin kinaz Src'nin ikincil mesajcı aktivasyonunu sağlar. Bu moleküllerin her ikisi de osteoklastojenez için gereklidir ve monosit/makrofaj kökenli hücrelerin farklılaşmasında yer alırlar (Boyce, B., 2013).

RANKL, TNF ailesinin bir üyesidir ve tip II membran proteinidir. RANKL, osteoklast farklılaşma ve aktivasyonunda kilit düzenleyicidir ve RANK üzerinden NF- $\kappa$ B (nükleer faktör- $\kappa$ B) ve NFATc1'i (aktif t hücrelerinin nükleer faktörü) aktive eder. RANKL-RANK etkileşiminden hemen sonra NF- $\kappa$ B aktivasyonu gerçekleşir ve bir süre sonra NFATc1 stimülasyonu meydana gelir (Boyce, B. F. ve Xing, 2008; Takayanagi ve ark., 2002). RANKL osteoklast farklılaşmasının en önemli uyarandır. RANKL aktivitesi, RANKL'ın reseptörü RANK'a bağlanarak aktivitesini sınırlayan osteoprotegerin (OPG) ile engellenir. OPG, osteoblastlar tarafından sentezlenen RANKL'ın RANK ile etkileşimini engelleyen bir sitokin reseptörüdür (Boyce, B. F. ve Xing, 2008, 2007b). Osteoklast farklılaşması Şekil 2.6'da gösterilmiştir.



Şekil 2.6: Osteoklastik farklılaşma şeması (General, 2004).

Osteoklast aktivasyonu sonrasında osteoklastlar kemotaksis ile kemik yüzeyine hareket eder. Osteoklast hücre membranının kemiğe bağlanması ile osteoklast-kemik bağlantısı bir sızdırmazlık bölgesi (sealing zone) oluşturur. Sızdırmazlık bölgeleri, özel yapılaşma yapıları (podozom) ile sınırlandırılmıştır (Basle ve ark., 1988; Vignery, 2000). Kemik matrisine bağlanma, osteopontin gibi kemik matris proteinlerindeki spesifik amino asit motifi Arg-Gly-Asp yoluyla, avp3 gibi integrin reseptörleri tarafından sağlanır (Icer ve Gezmen-Karadag, 2018). Osteoklast hücresi fırçası kenardan resorpsiyon boşluğuna hidrojen iyonu bırakır. Bu olay karbonik anhidraz ( $H_2O + CO_2 \rightarrow HCO_3^- + H^+$ ) enzimi ile katalizlenir. Ortamın asidik hale gelmesi ile kemikteki mineraller açığa çıkar ve mineralize kemik matrisi kalsiyum, fosfat, bikarbonat, su ve diğer maddelere ayrışır. Ayrışma sonrası hidrojen iyonları proton pompaları ile geri emilir. Kemiğin organik matrisi ise osteoklastın lizozomlarından kemiğe salınan katepsin ve MMP'ler gibi farklı matris yıkıcı enzimler ile parçalanır (Teitelbaum, 2000).

Osteoklastlardan salgılanan enzimlerin en önemlilerinden biri Katepsin K'dır. Bu enzim papain benzeri bir sistein proteazdır ve osteoklastlardan rezorptif çukura salgılanarak kollajeni parçalar. Katepsin K, tip I kollajen ve diğer non-kollajenöz proteinlerin bozunmasında rol oynayan başlıca proteazdır ve genetik eksikliği kemiğin yıkılmamasına neden olan bir hastalık türüne yol açar (Turk ve ark., 2012). Enzim aktivitesi, asidik koşulları gereksinir ve TRAP ile birlikte hücrelerarası matrisi parçalar. Katepsinlerin, K, B, C, D, E, G ve L dâhil olmak üzere farklı alttürleri bulunmaktadır ve tüm katepsinler serin, sistein veya aspartil proteaz aktivitesinden birini gösterirler. Katepsinler, katepsin K hariç lizozom içinde aktivite gösterir. Katepsin K ise hücrelerarası sıvıda aktivite gösterir (Stoka ve ark., 2016; Turk ve ark., 2012).

MMP'ler kalsiyuma bağımlı çinko içeren bir endopeptidaz ailesidir ve 20'den fazla üyesi vardır. Ekstrasellüler matrisin tüm üyelerini ve başka diğer molekülleri parçalayabilirler. Hücre reseptörlerinin yarılması, apoptoz bağlayıcıların serbest hale getirilmesi, bazı kemokin veya sitokinlerin inaktive edilmesi gibi farklı fonksiyonları da bulunmaktadır. MMPler ayrıca hücre çoğalması, farklılaşması, göçü gibi hücrel olaylarda ve apoptoz, anjiyogenez ve yara iyileşmesi gibi reaksiyonlarda da rol alırlar (Van Lint ve Libert, 2007; Visse ve Nagase, 2003). MMP-9, aynı zamanda jelatinaz olarak da adlandırılır ve osteoklast göçünde önemli rolü vardır. Osteoklastik aktivite ve kemik metabolizması açısından önemlidir. MMP-13'ün kemik rezorpsiyonunda ve osteoklast farklılaşmasında rol oynadığına inanılmaktadır. Yokluğu azalmış osteoklast sayıları, osteopetroz ve azalan kemik rezorpsiyonu ile ilişkilendirilmiştir (Van Lint ve Libert, 2007; Visse ve Nagase, 2003).

Osteoklast hücrelerinde ATP bağımlı H<sup>+</sup> transferi vardır ve bu transfer rezorpsiyon bölgesine asit taşınması ve kemiğin demineralizasyonu için gereklidir. Osteoklastlar, rezorpsiyon bölgesinde iyon salgısının etrafında bir sızdırmazlık alanı oluşturur ve bu sızdırmazlık bölgesinin konumlandırılması, osteoklast yüzeyinde ifade edilen integrinler aracılığı ile sağlanır. Sızdırmazlık bölgesi oluşturulduğunda, osteoklast rezorpsiyon alanına yaklaşır ve fırçamsı kenardan salgı aktivitesi başlar. Kemiğin rezorbe olmasıyla açığa çıkan mineral ve kollajen ürünleri osteoklast membranına ve oradan da hücre



dışına taşınır. Mineral ve kollajen ürünlerinin hücre dışından genel dolaşıma taşınması ile kemik resorpsiyon süreci sonar erer (Boyce, B., 2013; Boyle ve ark., 2003; Teitelbaum, 2000).

Osteoklastik aktivite ve kemik yıkımı, kemik yeniden şekillenme sürecinin ve kemik metabolizmasının önemli bir parçasıdır. Yeniden şekillenme, osteoblast ve osteoklast hücrelerinin ve bu hücrelerin öncüllerinin çok hassas bir organizasyonunu gerektirir ve bu süreç çok farklı yerel ve sistemik faktör tarafından kontrol edilir. Kemik yapım ve yıkım olaylarını etkileyen en önemli faktörler, osteoblast ve osteoklast hücrelerinin proliferasyon, farklılaşma ve apoptoz gibi hücrel faaliyetleridir. Dolayısıyla osteoblast sayısında bir artış ve osteoklast sayısında bir azalma, ilgili kemikte kemik yapımının daha baskın olmasını sağlayacaktır. Osteoklastların hücrel faaliyetleri, osteoblastlara oranla daha yavaş gerçekleşir ve osteoklastların daha az üretilmesi, farklılaşmalarının engellenmesi, aktivasyonlarının azaltılması veya yaşam sürelerinin kısaltılması ile osteoklastik aktivite önemli ölçüde engellenmiş olur (Hill, 1998; Lanyon ve ark., 1982; Müller ve Rügsegger, 1996; Seeman, 2003).

Kemik yapımı sırasında kemik yapım bölgesini eski kemikten ayıran proteinden oluşmuş ince ara madde hattı (çimento) bulunur ve bu çimento eski kemik ve yeni kemiğin güçlü bir biçimde birbirine bağlanmasını sağlar. Kemik oluşumu, kemiğe ilave güç kazandıran sıralı bir şekilde matris katmanlarına dizilen büyük aktif osteoblastlar tarafından gerçekleştirilir (General, 2004; Lanyon ve ark., 1982; Saladin, 2004). Kollajen matrisine minerallerin eklenmesi kemiğin yapım sürecini tamamlar. Yeniden yapılanma iskeletin yapısal ve de metabolik fonksiyonlarına hizmet ettiğinden, hem mineral metabolizmasını düzenleyen hormonlar hem de lokal faktörlerle etki eden mekanik yükler ve lokal hasar ile uyarılabilir. Lokal hasarın onarılması, yeniden yapılanmanın önemli bir işlevidir. Zamanla, iskelet üzerindeki küçük gerilmeler, kusurlu kemik alanlarına yol açabilir, mikro hasar olarak adlandırılır. Hasarlı kemiğin yeniden şekillenerek değiştirilmesi kemik gücünü geri kazandırır. Kemik yapımı için gerekli olan sinyaller osteosit ve osteoblast hücre ağları tarafından iletilir. Bu hücrel ağ bağlantıları, kemik üzerindeki küçük hasar alanlarını tespit ederek onarılmasını

sağlar. Osteoblast veya osteoklast hücrelerinin üretimi, farklılaşması, aktivitesi veya ömrünü etkileyen yerel veya sistemik faktörler, yeniden şekillenme döngüsünü etkileyebilir. Kemik kaybını azaltmak veya kemik oluşumunu arttırmak ve kemik sağlığını korumak amacıyla, bu yollarla hareket eden ilaçlar bulunmaktadır.

### **2.2.7 Osteoklast-osteoblast hücre iletişimi ve RANK/RANKL/OPG**

Osteoblast ve osteoklast hücreleri arasındaki etkileşim büyük ölçüde RANK/RANKL/OPG sinyal yolağı ile sağlanır. RANK, nükleer faktör  $\kappa$ B'nin reseptör aktivatörüdür ve birçok hücrenin yüzeyinde bulunur. Osteoklast öncül hücreleri ve osteoklastlar yüzeylerinde RANK reseptörlerini barındırır. RANK'ın reseptörü ise RANKL olarak adlandırılmaktadır ve osteoblast hücrelerinin yüzeyinde bulunmaktadır (Boyce, B. F. ve Xing, 2008, 2007b). RANK ve RANKL etkileşimi osteoklastik farklılaşma ve aktiviteyi artırır. RANKL aktivitesi OPG adı verilen RANK reseptörü ile sınırlandırılabilir. OPG osteoblastlar tarafından sentezlenen bir tuzak reseptördür. OPG'nin RANK'a bağlanması ile NF- $\kappa$ B aktivasyonu ile başlatılan osteoklastogenez ve kemik yıkımı engellenmiş olur (Boyce, B. F. ve Xing, 2008; Sundaram ve ark., 2013; Takayanagi ve ark., 2002).

Diş ve periodontal dokularda sağlık durumlarında RANK ve RANKL ekspresyonu diş sürmesi sırasında diş folikülünde ve yetişkinlik döneminde periodontal ligamentte eksprese edilir (Sokos ve ark., 2015). OPG'nin ise periodontal ligamentteki rolü biraz daha farklıdır ve OPG periodontal ligamentin homeostazında ve sement resorpsiyonunun önlenmesinde önemli bir faktördür (Hasegawa ve ark., 2002; Liu, Y. ve ark., 2016; Wada ve ark., 2001). Periodontal hastalık gelişiminden sonra ise periodontal dokularda RANKL ekspresyonu artarken OPG ekspresyonu azalır ve RANKL/OPG oranı RANKL lehine değişir. Periodontal ligament fibroblastlarında RANKL ekspresyonu bakteri atağı veya ligamente gelen mekanik kuvvetlerle artarken OPG seviyeleri ise düşüş gösterir (Bostancı ve ark., 2007; César-Neto ve ark., 2007; Mogi ve ark., 2004). OPG'nin periodontal dokulardaki koruyucu rolü, OPG'den yoksun farelerde hızlı ilerleyen bir periodontal hastalık ve erken başlayan bir kök rezorpsiyonu



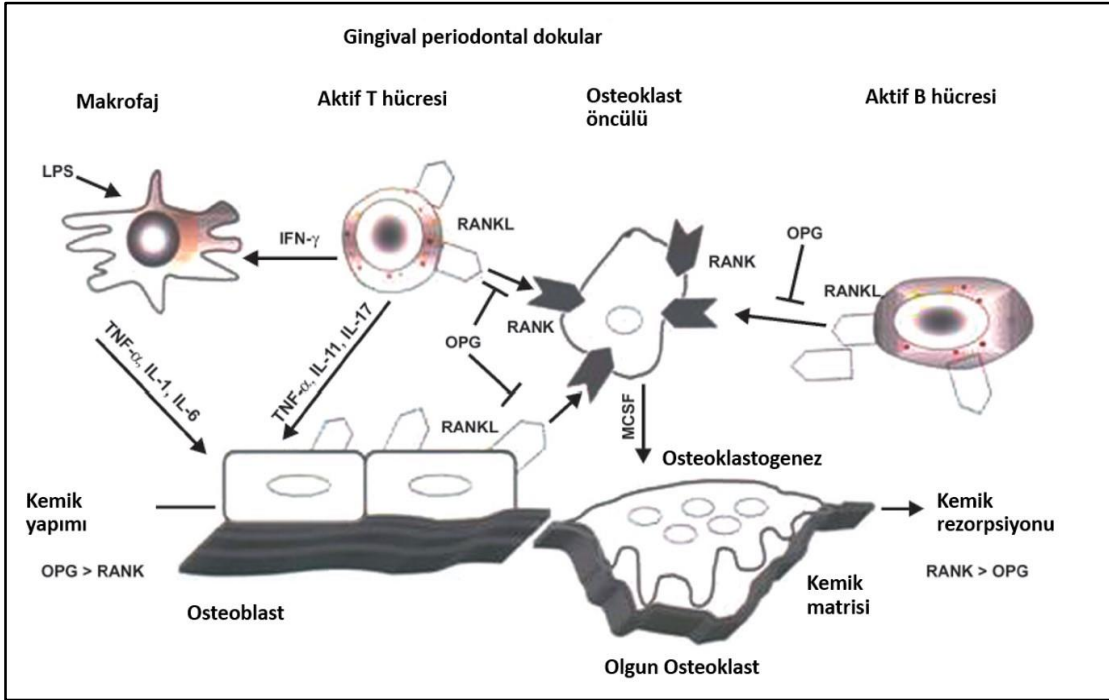
RANKL, osteoklastogenezdeki etkisine ilaveten T ve B hücre çoğalması ve sağ kalımı üzerinde de büyük etkiye sahiptir (Boyce, B. F. ve Xing, 2008, 2007b; Taubman ve ark., 2005; Theill ve ark., 2002).

RANKL'ın biyolojik aktiviteleri arasında kemokin indüksiyonu da bulunmaktadır. RANKL monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1) gibi kemoatraktanları uyararak damarlara monosit adhezyonunu, göçünü ve enflamasyon alanında monosit akümülyasyonunu artırır (Boyce, B. F. ve Xing, 2007b; Sundaram ve ark., 2013; Takayanagi ve ark., 2002). Benzer şekilde OPG de vasküler yapılara etki etmektedir. OPG eksikliğinin arterlerde kalsifikasyona yol açtığı belirtilmiştir (Kindle ve ark., 2006). RANK/RANKL/OPG yolağı sadece kemik yeniden şekillenme ve kemik metabolizmasında değil, vasküler sistemde, bağışıklık yanıtı ve kanser gelişiminde de rol almaktadır (Boyce, B. F. ve Xing, 2007b; Figueredo ve ark., 2019; Liu, Y. C. ve ark., 2010a; Sundaram ve ark., 2013; Theill ve ark., 2002).

RANKL aktivasyonu bakteriyel LPS'den önemli ölçüde etkilenmektedir ve LPS uyarımı sonrasında RANKL ekspresyonu artarken OPG ekspresyonu azalır ve IL-1 ve PGE<sub>2</sub>'nin de artmasıyla enflamasyon artar ve bu mediatörler osteoklastik aktiviteyi doğrudan indükleyebilir (Suda, K. ve ark., 2004). Enflamasyon durumunda ortamdaki RANKL miktarı nötrofillerin de aşırı üretimi ile ciddi ölçüde artmaktadır. Poubelle ve ark. tüm nötrofillerin RANKL sentezleyebildiğini ancak sadece osteoartrit veya romatoid artrit gibi sistemik enflamasyon durumlarında nötrofillerin RANK ve OPG sentezlediklerini göstermiştir (Poubelle ve ark., 2007). RANK ve RANKL aktivasyonu osteoklastogenez, enflamasyon, T hücre proliferasyonu ve RANKL aracılı diğer hücrel faaliyetler için gerekli olduğundan OPG ile RANKL inhibisyonu, RANKL'ın tüm bu faaliyetlerini sınırlandırmaktadır. Bu açıdan OPG enjeksiyonuyla RANKL aktivitesinin bloke edilmesi artrit, periodontitis, osteoporoz, kansere bağlı kemik metastazı ve kemik kaybı gibi hastalık ve durumları önemli düzeyde azaltabilir (Boyce, B. F. ve Xing, 2007a, 2008, 2007b; César-Neto ve ark., 2007; Mogi ve ark., 2004; Sojod ve ark., 2017; Sundaram ve ark., 2013; Takayanagi ve ark., 2002; Theill ve ark., 2002).

RANK/RANKL/OPG triadı periodontal hastalıklar dâhil olmak üzere birçok enflamatuvar hastalık ve durumda rol almaktadır. Periodontal dokularda RANKL/OPG seviyeleri özellikle periodontitis varlığında RANKL lehine değişmektedir. RANKL/OPG oranı periodontitisli bireylerde gerek dokuda gerekse fibroblast hücrelerinde yüksek bulunurken sağlıklı bireylerde düşük bulunmuştur ve bu oranın periodontal hastalık için önemli bir gösterge olduğu sonucuna varılmıştır (Bostancı ve ark., 2007; César-Neto ve ark., 2007; Hasegawa ve ark., 2002; Mogi ve ark., 2004; Sojod ve ark., 2017). Bu nedenle RANKL/OPG sistemi periodontal hastalık oluşum ve ilerlemesinde oldukça önemlidir.

Nötrofil hücrelerine ek olarak, T ve B hücrelerinin de dokulardaki RANKL miktarına ve osteoklastogenez artışına önemli oranda katkı sağladığı ifade edilmiştir (Taubman ve ark., 2005). Ayrıca, uygun uyarım sonucunda, TNF- $\alpha$  ve IL-1 gibi pro-enflamatuvar sitokinlerin osteoklast aktivasyonunu arttırdığı ve RANKL ekspresyonunu indüklediği de bilinmektedir. TNF ve IL'lerin osteoklastik aktivite üzerindeki etkileri RANKL yokluğunda gerçekleşmez ve OPG varlığında TNF ve IL'lerin bu etkisi engellenir (Dinarello, 2000; Figueredo ve ark., 2019; Graves ve Cochran, 2003; Lacey ve ark., 1998; Liu, Y. C. ve ark., 2010a; MacEwan, 2002; Sojod ve ark., 2017; Takayanagi ve ark., 2002). Bu nedenle, OPG ve RANKL etkileşimleri osteoklast farklılaşmasını ve aktivasyonunu kontrol etmede çok kritik ve önemli bir rol oynar. Gingival ve periodontal dokularda RANKL/OPG, osteoblast, osteoklast, T ve B hücreleri Şekil 2.8'de gösterilmiştir.



Şekil 2.8: RANKL, OPG ve savunma hücreleri. Taubman ve ark.'nın makalesinden Türkçe'leştirilmiştir (Taubman ve ark., 2005).

## 2.2.8 Kemik morfolojisi ve histolojik boyama

Hematoksinin ve eozin boyaması (H & E) ile aktif osteoblastların sitoplazması pürüzlü endoplazmik retikulumun çokluğuna bağlı olarak bazofilik görünümündedir. Aktif osteoblast, çok miktarda kollajen tip I üretir. Osteoblastın çekirdeği küresel ve geniştir. Aktif bir osteoblast, histolojik olarak çekirdeğe bitişik bir açık bölge olarak görünen belirgin bir Golgi aygıtı tarafından morfolojik olarak karakterize edilir. Hücrenin ürünleri çoğunlukla mineralize olmayan matris olan osteoid içine taşınır. Aktif osteoblastlar, Tip-I kollajene karşı antikorlar ile veya doğrudan alkalin fosfat enzim aktivitesini göstermek için naftol fosfat ve diazonyum dye fast blue kullanılarak gösterilebilir (An ve Martin, 2003). Osteoklast hücreleri ise kemikte lakünelarda bulunan çok çekirdekli dev hücrelerdir. İçerdikleri lizozom ve vakuoller nedeniyle köpüğümsü bir sitoplazmaya sahiptirler. Morfolojik olarak ayırt edilebilecekleri gibi TRAP boyaması ile de ayırt edilebilirler (An ve Martin, 2003; Boyce, B., 2013; Boyle ve ark., 2003).

### 2.3 Deneysel Periodontitis Modelleri

Periodontal hastalık patogenezini ve çeşitli periodontal tedavilerin etkinliklerini değerlendirmek için hayvan modelleri sıkça kullanılmaktadır. Deneysel çalışma sonuçlarının insanlara uyarlanabilmesi açısından, insanlardakine benzer bir anatomiye sahip olan ve insan periodontal hastalığını taklit edebilen bir deney hayvanı seçmek önemlidir. Periodonsiyumun enflamatuvar yıkımı fareler, sıçanlar, tavşanlar ve maymunlar gibi birçok deney hayvanında türe göre spontan gelişebilir veya deneysel olarak oluşturulabilir (Struillou ve ark., 2010; Weinberg ve Bral, 1999).

Periodontal hastalıkları araştırmak için en çok çalışılan hayvan gruplarından biri kemirgenlerdir. Bunlar arasında da sıçanlar özellikle öne çıkmaktadır. Sıçan periodontal doku ve periodontal hastalıkları bazı özelliklerinden dolayı insanlardakinden farklıdır. Sıçanlarda her yarım çenede bir keser diş ve 3 molar diş bulunur. Keser dişler köksüzdürler ve sürmeleri ömür boyu devam eder, molar dişlerin sürme süreci bir süre sonra tamamlanır. Ayrıca insanlarda keratinize olmayan sulkuler epitel sıçanlarda tam keratinizedir (Struillou ve ark., 2010).

Sıçanlar periodontal hastalıklara karşı oldukça dirençlidir. Periodontal hastalık insanlardaki kadar sık görülmez ancak bakteri inokülasyonu, karbonhidrattan zengin diyet ve/veya subgingival ligatür yerleştirilmesi ile periodontitis deneysel olarak geliştirilebilir (Struillou ve ark., 2010). *A. actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Capnocytophaga sputigena*, *Eikenella corrodens* ve *Fusobacterium nucleatum* gibi bakteriler sıçanlarda deneysel periodontal hastalık oluşturmak için kullanılan bakteri türlerindedir (Klausen, 1991; Struillou ve ark., 2010; Weinberg ve Bral, 1999). Mikropsuz (steril, germ-free) sıçanlar plak bakterileri ve periodontal hastalık patogenezindeki rollerini çalışmak için oldukça uygundur. Mikrobiyal inokulasyondan sonra germ-free sıçanlarda çok hızlı bir periodontal yıkım gelişir. İnsanlarda periodontal yıkım kök yüzeyi boyunca ilerleme eğilimindeyken sıçanlarda birleşim epiteli apikale göçmeden kemik yıkımı ilerleyebilir. Bakteriyel inokulasyona

karşı gingival yanıt insanlarda kronikken sıçanlarda akut bağışıklık bir yanittir (Weinberg ve Bral, 1999).

Ligatürle oluşturulan deneysel periodontitis modelinde ligatüre bağlı plak birikiminin neden olduğu bakteriyel uyarım sıçan periodontal dokularında enflamatuvar infiltrat birikimi, osteoklast oluşum ve aktivitesinde artış, kemik kaybı, ataçman kaybı ve kemik dokusunda fibrotik doku artışına yol açar (de Lima ve ark., 2000). Başlangıç lezyonunda nötrofil çoğunluğu varken sonrasında mononükleer hücre infiltratında artış, osteoklast sayısında artış ve sement ve alveol kemik rezorpsiyonu gözlenir. Bu enflamatuvar değişiklikler lokal enflamatuvar mediatör salınımında artışla açıklanabilir. Ayrıca sıçanlarda gıda tüketimine bağlı olarak çok hızlı bir okluzal atrizyonla birlikte dişlerde okluzal, distal ve bukkal yöne doğru migrasyon oluşur (Gorustovich ve ark., 2008). Bu atrizyona bağlı olarak sürekli bir sement yapımı ve dişlerde sürme durumu vardır. Bu da mine sement sınırı ile alveol kret tepesi arasındaki mesafede artışa yol açar. Bu artış 0,8 mm'ye kadar ulaşabilir. Bu durum patolojik bir kayıptan ziyade yaş ile ilişkili fizyolojik bir fenomendir (Kuhr ve ark., 2004; Struillou ve ark., 2010).

## **2.4 Uçucu Yağların Etkileri**

### **2.4.1 Tarçın uçucu yağı ve biyolojik etkileri**

Tarçın, *Cinnamomum zeylanicum* ağaç türünün iç kabuğundan elde edilen bir baharattır. Tarçın çeşitli yiyecekler içeceklerde aromatik bir çeşni ve tatlandırıcı katkı maddesi olarak kullanılır. Tarçın aroması içerisinde en yüksek miktarda bulunan sinamaldehid bileşiğinden gelmektedir. Toz halindeki tarçın yaklaşık olarak % 11 su, % 81 karbonhidrat (% 53 diyet lifi dâhil), % 4 protein ve % 1 yağdan oluşur. Zengin bir kalsiyum, demir ve K vitamini kaynağıdır (Nabavi ve ark., 2015). Tarçın ağacının kabuğu, yaprakları, çiçekleri, meyveleri ve kökleri de dâhil olmak üzere her kısmının geleneksel tıpta kullanılan tıbbi etkileri veya mutfak kullanımı bulunmaktadır. Tarçın uçucu yağı tarçın ağacının kabuk, yaprak ve kök tomurcuklarından elde edilir ve elde edildiği bölge uçucu yağın bileşiminde ve fitoterapötik etkisinde önemlidir. Tarçın anti-



mikrobiyal ve antioksidan özelliklere sahiptir ve kan basıncı, glisemik kontrol ve lipit metabolizması üzerinde de güçlü etkileri bildirilmiştir (Ranasinghe ve ark., 2013; Zhu ve ark., 2017). Tarçın ağacının en sık kullanılan ürünlerinden biri, kabuğundan elde edilen uçucu yağdır. Tarçın kabuğu uçucu yağı başlıca 3 ana bileşenden oluşur. Bu bileşenler, trans-sinamaldehit, öjenol ve linaloldür. *trans*-Sinamaldehit uçucu yağın %50-90'ını oluşturur ve tarçının tıbbi etkilerinin çoğunluğu içerdiği sinamaldehite atfedilir (Nabavi ve ark., 2015; Ranasinghe ve ark., 2013; Vasconcelos ve ark., 2018; Zhu ve ark., 2017). Sinamaldehitin farklı hücre tipleri ve dokularda farklı biyolojik etkileri bulunmaktadır. Bunlar, antibakteriyel etki, kanser hücrelerinde apoptoz indüksiyonu ile anti-kanser etkisi, duyuşal nöron uyarımı, yağ yıkımında artış ve anti-hiperglisemik etki olarak bildirilmiştir (Bostancı ve ark., 2007; Huss ve ark., 2002; Lohinai ve ark., 2001; Miyauchi ve ark., 2004; Nabavi ve ark., 2015; Ranasinghe ve ark., 2013; Sadeghi ve ark., 2019; Smith ve ark., 1996; Vasconcelos ve ark., 2018; Wang ve ark., 2018; Wińska ve ark., 2019; Zhu ve ark., 2017).

Tarçın yağının antibakteriyel etkisi, büyük ölçüde içerisinde en çok bulunan molekül olan *trans*-sinamaldehitten kaynaklanmaktadır. *trans*-Sinamaldehit, bakteri hücre duvarında bulunan fosfolipitlerden geçerek hücre içine giren ve proteinlerin fonksiyonuna engel olabilen fenolik bileşiklerden zengin bir moleküldür (Vasconcelos ve ark., 2018). Tarçın hücre membranına zarar vererek gösterdiği antibakteriyel etki, *P. gingivalis* gibi virülansı yüksek gram negatif bakterilerde bile gösterilmiştir (Wang ve ark., 2018). Ek olarak tarçın, ATPaz aktivitesini engelleyerek, hücre bölünmesini önleyerek, membrandaki porinlerin fonksiyonunu ve iyon taşınımını bozarak, hücre hareketliliği, biyofilm oluşumu ve quorum sensingi engelleyerek de antibakteriyel etki sağlamaktadır (Vasconcelos ve ark., 2018). Tarçının bir diğer önemli etkisi ise metabolik regülasyondur. Tarçın ve içerdiği sinamaldehit kahverengi yağ dokusunu uyarır, yağ dokusunun lipoliz ve oksidasyonunu artırır ve glikoz alımını artırır.

Ek olarak tarçın COX-2, MCP-1, TNF- $\alpha$ , IL-6 ve IL-1 $\beta$ 'yi azaltarak güçlü bir anti-enflamatuvar etkiye de sahiptir (Ranasinghe ve ark., 2013; Zhu ve ark., 2017). Chen ve ark. tarçın yağının majör bileşeni olan *trans*-sinamaldehitin LPS ile indüklenen NO

üretimini bloke ettiğini ve NF-κB yolağını engelleyerek TNF-α, iNOS ve COX-2 protein ekspresyonlarını önemli ölçüde azalttığını bulmuştur (Chen, Y.-F. ve ark., 2016). Tarçının anti-enflamatuvar etkisi başlıca NF-κB aktivasyonunu engellemesi, NO ve iNOS sentezini azaltması ve COX-2, IL-1β, IFN-γ ve TNF-α'yı bloke etmesiyle sağlanmaktadır (Baker, I. ve ark., 2013; Kanuri ve ark., 2009; Kim, M. E. ve ark., 2018; Kwon, H.-K. ve ark., 2011; Kwon, J.-Y. ve ark., 2012; Li, R. ve ark., 2013). Bunun yanında tarçın, IL-6 ve IL-12 seviyelerini azaltarak, T hücre çoğalmasını önleyerek ve anti-enflamatuvar sitokin IL-10 miktarını arttırarak da enflamasyonu önlemektedir (Kwon, H.-K. ve ark., 2011). Tarçın kemik metabolizmasını düzenlemede de önemli role sahiptir (Mendi ve ark., 2017). Tsuji-Naito tarçının c-fos/NFATc1 yolağını engelleyerek RANKL ile indüklenmiş osteoklastogenezini önlediğini göstermiştir (Tsuji-Naito, 2008). Tarçının ayrıca osteoporozlu sıçanlarda ALP, runx2, OCN ve tip kollajen üretimini, osteoblast farklılaşma ve çoğalmasını arttırarak ve osteoklast sayısını azaltarak kemik yapımını arttırıp yıkımını azalttığı bildirilmiştir (Wu ve ark., 2018). Osteoporozlu sıçanlarda kemik yapımına ek olarak anjiyogenezin arttığı da gösterilmiştir (Weng ve ark., 2019). Tarçının enflamasyonu önleme, osteoklastik aktiviteyi azaltarak osteoblastik aktiviteyi arttırma etkisi periodontal hastalığın önlenmesinde oldukça önemlidir.

#### **2.4.2 Karanfil uçucu yağı ve biyolojik etkileri**

Karanfil, *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry olarak bilinen, Endonezya'da tropikal bir adada yetişen bir ağacın aromatik çiçek tomurcuklarıdır ve genellikle baharat olarak kullanılırlar (Chaieb ve ark., 2007; Yogalakshmi ve ark., 2010). İçeriğinde en çok bulunan bileşik yaklaşık olarak %9-%15 oranlarında olan bir hidroksifenol propen olan öjenoldür. Karanfil yağının topikal uygulamaları ağrı giderici olarak ve iyileşmeyi hızlandırmak için kullanılır (Chaieb ve ark., 2007). Karanfilin ayrıca antimitojenik, anti-enflamatuvar, anestetik ve antioksidan etkileri bildirilmiştir (Bakour ve ark., 2018; Huss ve ark., 2002; Miyazawa ve Hisama, 2003; Ogata ve ark., 2000; Wińska ve ark., 2019; Yogalakshmi ve ark., 2010) (Moon ve ark., 2011; Zhang, Y., Wang, ve ark., 2017). Karanfilin bilinen en önemli etkisi antibakteriyel etkisidir ve

bu etki içindeki öjenolden kaynaklanmaktadır (Moon ve ark., 2011; Zhang, Y., Wang, ve ark., 2017). Öjenol, bakteri hücre membran şekil ve bütünlüğünü bozarak, iyon taşınımını engelleyerek, bakterilerin belirli enzim sentezini önleyerek ve hücre içi reaktif oksijen türevi (ROS) üretimini arttırarak hücre ölümü sağlamaktadır (Marchese ve ark., 2017).

Karanfil uçucu yağı güçlü bir antimikrobiyal ajandır. En dirençli patojenik bakterilere, *Staphylococcus aureus* dâhil, etki göstermektedir ancak bu etkisi, fibroblast ve osteoblast hücreleri gibi yapısal konak hücrelerini de olumsuz etkileyebilmektedir (Junka ve ark., 2019). Bununla birlikte, karanfil ekstraktının LPS ile indüklenen nötrofil sayılarını azaltarak ve nötrofillerden myeloperoksidaz, MMP-2 ve MMP-9 üretimini önleyerek önemli bir anti-enflamatuvar etki sağladığı da bildirilmiştir (Chniguir ve ark., 2019). Karanfil uçucu yağının dental pulpa kök hücrelerinde TNF- $\alpha$  uyarımı sonrasında IL-6 seviyesini önemli ölçüde düşürdüğü ve pulpa hücre canlılığını etkilemediği gösterilmiştir (Mendi ve ark., 2017). Bununla birlikte, karanfil yağı COX-2 üretimini azaltarak da anti-enflamatuvar etki sağlamaktadır (Baker, I. ve ark., 2013). Karanfil yağı, deney hayvanlarında oluşturulan enflamasyonu da dalak, karaciğer, kalp ve mide gibi organlara yan etki göstermeden önemli ölçüde önlemiştir (Ibrahim, F. M. ve ark., 2017).

Karanfil yağı içindeki öjenol sayesinde kemik metabolizması üzerinde de kritik bir role sahiptir. Öjenolün RANKL ile indüklenen osteoklastik aktiviteyi engellediği, NF- $\kappa$ B yolağını bloke ettiği ve doku yıkım enzimleri TRAP, katepsin K ve MMP-9 üretimini önemli düzeyde düşürdüğü gösterilmiştir (Deepak ve ark., 2015). Ayrıca karanfil yağının osteoporozün yol açtığı kemik densitesi, dayanıklılığı ve mineral içeriğindeki azalmayı önlemeden başarılı bulunduğu da bildirilmiştir (Karmakar ve ark., 2012). Sahip olduğu anti-enflamatuvar, antioksidan ve kemik metabolizması üzerine etkileri sayesinde karanfil yağı periodontal enflamasyon ve ilişkili hastalıkları önlemede başarılı olabilir.

Uçucu yağlar çok farklı biyolojik etkilere sahip doğal ajanlardır. Ancak uçucu yağların birçoğu ısı, ışık, oksijen, nem gibi koşullardan etkilenecek hızlı bir bozulmaya uğrayabilir. Ek olarak ağız yoluyla alımları sonrasında kana karışana kadar bozulmaya uğrayabilir veya biyoyararlanımları düşebilir. Bu nedenle uçucu yağların fiziksel ve kimyasal yapılarının bozulmadan biyoyararlanımlarının artması amacıyla lipozom formülasyonları geliştirilmiştir.

## 2.5 Lipozom

Lipozom en az çift tabakalı bir lipit katmanının bir ajanı çevrelediği küresel vezikül formunda bir oluşumdur. Lipozomların dış tabakaları fosfolipitlerden oluşur ve iki tabakalı bu fosfolipit yapısı içerisinde taşınan maddeyi çevreler (Dua ve ark., 2012). Lipozom hazırlamak için genel hatları ile birbirine benzeyen ancak farklı bazı yöntemler vardır ve bu yöntemlerin seçimi:

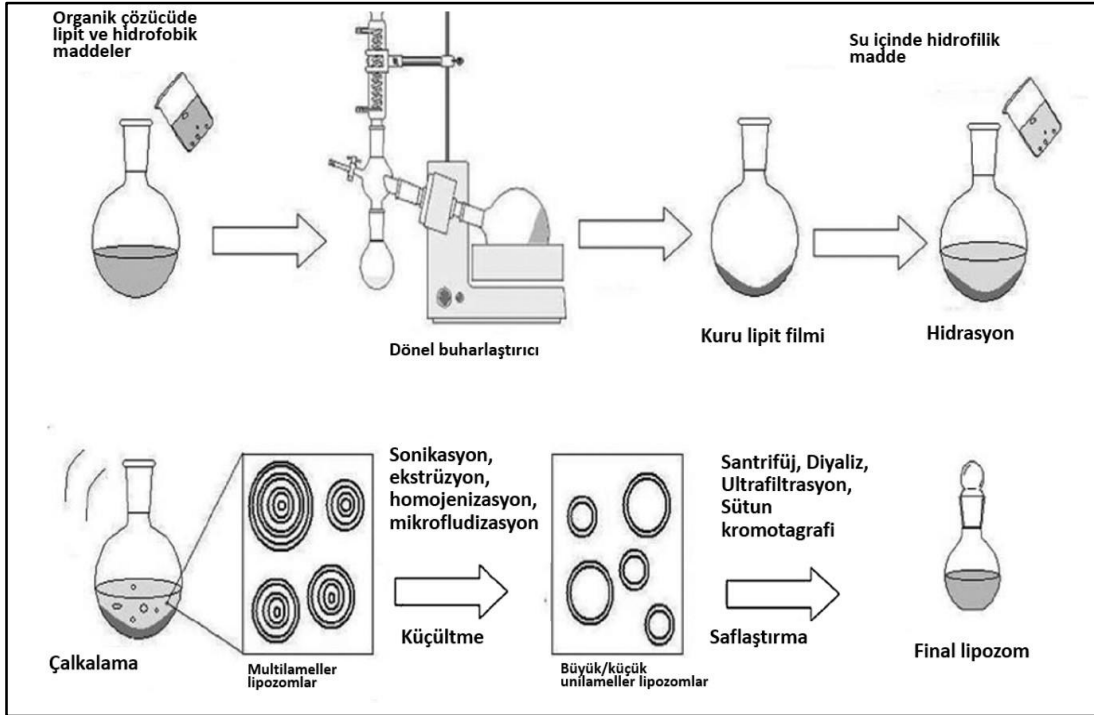
- Kapsüllemesi istenen malzemenin ve lipozomal bileşenlerin fizikokimyasal özelliklerine
- Lipit veziküllerin oluşturulacağı sıvının yapısına
- Kapsüllenecek maddenin etkili konsantrasyonu ve toksisitesine
- Vezikül oluşturulması sırasında gerekli olan ilave işlemlere
- Hedeflenen lipozom uygulaması için elde edilecek olan veziküllerin büyüklük, dispersite (dağılıma) ve raf ömrüne
- Verimli ve güvenli büyük ölçekli üretim gerekliliğine bağlıdır (Akbarzadeh ve ark., 2013; Reza Mozafari ve ark., 2008).

Lipozom oluşumu için ilk olarak polar bir çözücüde lipitlerin ve kapsüllenecek maddenin çözülmesi gereklidir. Daha sonra çözücünün uzaklaştırılarak lipit ve ajanın su içinde dağılımı sağlanır ve sonikasyon lipozom oluşumu için genellikle uygulanan bir yöntemdir. Ancak sonikasyonun eksik yapılması düzgün olmayan çok katmanlı

lipozomlara yol açabileceği gibi çok fazla yapılması da kapsüllenecek madde ve lipozomda hasar oluşturabilir (Sherry ve ark., 2013).

Geleneksel lipozomların ana malzemeleri lesitin ve kolesterol gibi doğal ve güvenli bileşenlerdir. Lipozomlar, biyoyumluluk, biyoyararlanım, çözünmeyen bileşiklerin çözünmesi ve sürekli salım performansı gibi birçok avantaja sahiptir (Kim, H.-H. Y. ve Baianu, 1991; Neethirajan ve Jayas, 2011). Lipozom kapsüllemesi ile uçucu yağların uçuculuğu ve kimyasal kararsızlığı kimyasal içerikleri değiştirilmeden azaltılabilir. Lipozomlar ayrıca hücrelerin pasif absorpsiyon mekanizmasını güçlendirebilen ve malzemelerin taşınma direncini azaltabilen hücre altı boyutlarından dolayı uçucu yağların antimikrobiyal aktivitesini de artırabilir (Jun-xia ve ark., 2011). Lipozomlar biyolojik olarak uyumlu, vücut sıvılarında çözünebilir, toksik ve immünojenik olmayan yapılardır. Kapsülledikleri ajanların farmakokinetiklerini ve biyodağılımını arttırarak, toksisitelerini azaltarak ve ajanlara hedef seçiciliği sağlayarak ajanın serbest kullanımına avantaj sağlarlar (Dua ve ark., 2012).

Farklı uçucu yağ lipozomu hazırlama yöntemleri tanımlanmıştır. Bunlardan başlıcaları ince film hidrasyon yöntemi, ters faz buharlaştırma yöntemi ve süperkritik sıvı teknolojileri yöntemleridir ve bu yöntemler de zamanla modifiye edilerek farklı alternatifleri oluşturulmuştur (El Asbahani ve ark., 2015). Bu yöntemler içinde küçük ölçekli kullanımlara en uygun ve hazırlaması en pratik olan yöntemlerden biri ince film hidrasyon yöntemidir (Sherry ve ark., 2013). Ancak bu yöntem çok lamelli nispeten büyük lipozomların oluşmasını sağlar. Lipozom büyüklüğünü azaltmak ve multilameller yapıyı küçültmek için ekstrüzyon, homojenizasyon veya sonikasyon gibi işlemlere ve elde edilen lipozomu saflaştırmak için de santifüj, ultrafiltrasyon veya diyaliz gibi yöntemlere gereksinim vardır (El Asbahani ve ark., 2015). İnce film hidrasyon yöntemi ile lipozom hazırlama Şekil 2.9'da gösterilmiştir.



Şekil 2.9: İnce film hidrasyon yöntemi ile lipozom hazırlama. Asbahani ve ark.'nın makalesinden Türkçe'leştirilmiştir (El Asbahani ve ark., 2015).

Lipozomlar hapsedtikleri maddenin etkinlik süresini uzatarak, hedef organına varana kadar bozulmasını engellerler (El Asbahani ve ark., 2015; Sebaaly ve ark., 2015; Sherry ve ark., 2013). Bu avantajları sayesinde lipozomlar karanfil yağının içerdiği öjenol gibi yüksek dozlarının konak hücrelerini olumsuz etkileyebileceği durumları engelleyebilirler. Ayrıca esansiyel yağların kararsızlığını önleyerek, karanfil yağının içerdiği öjenol ve tarçın yağının içerdiği sinnamaldehit gibi etken maddelerin etki süresini uzatarak biyoyararlanımını arttırabilirler. Bu sayede, tarçın ve karanfilin anti-enflamatuvar ve antimikrobiyal etkileri enfeksiyöz ve enflamatuvar hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde yardımcı olabilir.

## 2.6 Hipotez ve Amaç

Bu çalışmanın hipotezi, antibakteriyel ve anti-enflamatuvar etkilere sahip olduğu bilinen uçucu yağların lipozoma hapsedilmiş formlarının deneysel periodontitise bağlı oluşan enflamasyon ve kemik yıkımını önleyebileceği yönünde kurulmuştur.

Bu çalışmanın amacı kuvvetli antibakteriyel ve anti-enflamatuvar etkiye sahip olan tarçın ve karanfil uçucu yağ lipozomlarının deneysel olarak oluşturulmuş periodontitisi önlemedeki etkisinin araştırılmasıdır. Bu amaçla;

- Lipozoma hapsedilmiş tarçın ve karanfil yağlarının alveol kemik kaybı seviyelerine etkisinin belirlenmesi,
- Lipozoma hapsedilmiş tarçın ve karanfil yağlarının periodontal ligamentteki enflamatuvar hücre sayılarına ve enflamatuvar göstergeler olan iNOS ve COX-2 alveol kemikte ve periodontal ligamentteki seviyelerine etkisinin belirlenmesi ve
- Lipozoma hapsedilmiş tarçın ve karanfil yağlarının kemik dokusundaki osteoblast ve osteoklast sayılarına ve kemik yıkım göstergeleri olan RANKL ve OPG seviyelerine etkisinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1 Çalışma Tasarımı ve Gruplar

Bu araştırma Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır. Araştırmada ortalama 250-300 gr ağırlığında Wistar cinsi dişi sıçanlar kullanılmıştır. Toplamda 28 adet sıçan  $21\pm 1^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta, 12 saat aydınlık/karanlık ışık döngüsü ve %40-60 nem oranı standardını sağlayacak şekilde ayrı metal kafeslerde tutulmuştur. Çalışmanın deneysel aşamaları Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmada 28 adet sıçan rastgele 4 çalışma grubuna bölünmüştür. Negatif kontrol grubundaki sıçanlarda deneysel dişeti hastalığı oluşturulmamıştır. Hastalık grubu ve deney gruplarındaki sıçanlarda deneysel dişeti hastalığı oluşturulmuştur. Dişeti hastalığı oluşturulması için hayvanların alt çene birinci büyük azı dişleri seçilmiştir. Dişeti hastalığı bakteri inokülasyonu ve ligatür yerleştirilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Çalışma grupları aşağıdaki şekilde oluşturulmuştur:

1. Kontrol grubu (Negatif kontrol grubu, K, n=6 sıçan), sıçanlara herhangi bir hastalık oluşturulmamıştır ve herhangi bir tedavi uygulanmamıştır.
2. Periodontitis grubu (Hastalıklı kontrol grubu, P, n=6 sıçan), deneysel olarak dişeti hastalığı (periodontitis) oluşturulmuş ve sıçanlar çalışma sonuna kadar tedavi edilmeden bekletilmiştir.
3. Tarçın yağı lipozomu grubu (Deneysel hastalık+tarçın yağı lipozom, TLp, n=8 sıçan), deneysel olarak dişeti hastalığı oluşturulmuş ve sıçanlar çalışma sonuna kadar tarçın yağı içeren lipozom süspansiyonu ile tedavi edilmiştir.
4. Karanfil yağı lipozomu grubu (Deneysel hastalık+karanfil yağı lipozomu, KLp, n=8 sıçan), deneysel olarak periodontitis oluşturulmuş ve sıçanlar çalışma sonuna kadar her gün karanfil yağı içeren lipozom süspansiyonu ile tedavi edilmiştir.



### 3.1.2 Deneysel periodontitis oluşturulması ve lipozom uygulaması

Deneysel periodontitis ligatür yöntemi ile birlikte bakteri inokülasyonu ile gerçekleştirildi. Bakteri enfeksiyonu için insanlarda hızlı ilerleyen ve tedaviye zayıf yanıt veren bir periodontitis modeli ile ilişkili olan, virülansı yüksek, çoğaltılması ve uygulaması daha pratik olan patojenik bir bakteri olan *A. actinomycescomitans* tercih edildi.

#### Bakteri kültürünün hazırlanması

*A. actinomycescomitans* Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection, ATCC33384) firmasından satın alınmıştır. Soğuk zincir taşıma ile gelen bakteriler firmanın direktifleri doğrultusunda +4°C'de saklanmıştır. Bakteri kültürü hazırlanırken genel sıvı besi yeri ve Mueller-Hinton agar besi yeri kullanılmıştır. Nutrient Broth (Merck, Darmstadt, Almanya) üretici firmanın önerileri dikkate alınarak, distile su içerisinde 8 g/L olacak şekilde eritildikten sonra 121°C'de 15 dakika otoklavlanmıştır. Hazırlanmış olan besiyerinin pH' ı 25° C' de 7±0.2'dir. Her bir bakteri için 500 mikrolitre (µL) NB olacak şekilde steril cam tüplere aktarılmıştır. Sonra steril metal spatül aracılığıyla stok kültürden alınan bakterilerin inokülasyonu gerçekleştirilmiştir.

Mueller-Hinton Agar (Oxoid, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD) besiyeri, firmanın direktifleri doğrultusunda 38.0 g/L olacak şekilde distile su içinde ısıtılarak eritilip, otoklavda 121°C 'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Daha sonra 45-50° C'ye soğutulup, %5'lik fibrinsiz koyun kanı ilave edilip kanlı agar oluşturulmuş, steril petri kaplarına 20'şer ml olacak şekilde dökülmüştür. Hazırlanmış besiyeri berrak ve açık kırmızı renkte olup, 25 °C 'da pH'sı 7.3±0.1'dir. Stok kültürden alınarak inokule edilmiş bakterileri içeren NB'tan 10 µL alınarak kanlı agar plak üzerine cam bağıt aracılığıyla yayma tekniği kullanılarak ekim yapılmıştır. *A. actinomycescomitans* %5'lik CO<sub>2</sub>'li ortamda 37°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Çalışma esnasında mikroorganizmaların saf kültür olarak üreyip üremediği kontrol edilmiştir.

Elde edilen bu kültürden bir klon toplanmış ve genel sıvı besi yerine alınmıştır. 4. günde bakteriler toplanarak ve 7000g'de 15 dk. santrifüj edilmiştir. Final konsantrasyon %2lik metilselüloz içeren fosfat tampon solüsyonda  $10^8$ /ml olacak şekilde spektrofotometrik olarak ayarlanmıştır. Elde edilen bakteri solüsyonu aşağıdaki protokolle uygulanmıştır.

Tüm sıçanlara orijinal oral bakteri yükünü azaltmak için 4 gün boyunca antibiyotik tedavisi (Devapen, Deva holding, İstanbul, Türkiye, 1x1) verilmiş ve sonrasında 3 gün antibiyotik uygulanmaksızın beklenmiştir. Elde edilen bakteri solüsyonu günde 1 kez 2 gün aralıklar toplamda 3 kez olmak üzere ağız boşluğuna uygulanmıştır. Periodontitis oluşturulmayan olan hayvanlara metilselüloz içeren fosfat tampon uygulanmıştır.

### 3.1.3 Ligatür yerleştirilmesi

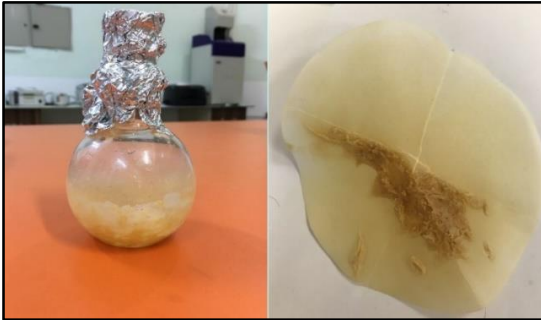
Bakteri inokülasyonu sonrasında ligatür yerleştirmek için sıçanlar ksilazin (Rompun, Bayer, Leverkusen, Almanya, 3mg/kg i.p.) ve ketamin hidroklorür (Ketalar, Eczacıbaşı, İstanbul, Türkiye, 90mg/kg i.p.) ile anestezi altına alınmıştır. Tüm hayvanların alt çene birinci büyük azı dişlerinin çevresine steril ipek ligatürler yerleştirilmiştir. Yerleştirilen bu ligatürler ortamda yiyecek artıklarının ve ağız bakterilerinin daha fazla birikmesine ve kolonizasyonuna yol açarak dişetlerinde iltihabi bir reaksiyon başlatmıştır. Ligatür yerleştirilen sıçanların temsili fotoğrafı Şekil 10'da gösterilmiştir.



Şekil 3.1: Wistar Albino Sıçan. Anonim, 15/12/2019

### 3.1.4 Lipozom hazırlanması

Lipozomlar literatürde daha önce tanımlanmış olan bir protokole göre ilgili yayınlar referans alınarak hazırlanmıştır (Ajiboye ve ark., 2019; Altuntaş ve ark., 2014; Peters ve Caldwell, 1994). Kullanılması planlanan uçucu yağlar ticari olarak satın alınmıştır (SNS GIDA KOZMETİK TİC. ve SAN. LTD. ŞTİ.). Tarçın uçucu yağı soğuk sıkım yöntemi ile elde edilmiş olan ve ana bileşeni trans-sinnamalehitten oluşan bir uçucu yağdır. Karanfil uçucu yağı ise su distilasyon yöntemiyle elde edilmiş olan ve ana bileşen öjenol olan bir uçucu yağdır. Tarçın uçucu yağı lipozomu hazırlamak için 8.4 gr tarçın uçucu yağı, 2 gr soya lesitini ve 0.4 gr kolesterol kullanılmıştır. Karanfil uçucu yağı lipozomunu hazırlamak için 2.8 gr karanfil uçucu yağı, 2 gr soya lesitini ve 0.4 gr kolesterol kullanılmıştır. Soya lesitini ve kolesterol (Sigma Aldrich, Missouri, ABD) (5: 1) triklorometan içerisinde çözündürülüp, kullanılacak uçucu yağ ile karıştırılmıştır. Karışım bir döner buharlaştırıcıda ince bir film oluşana kadar buharlaştırılmış ve vakumlu bir fırında 30 °C'de 24 saat kurutulmuştur. Ardından, lipit filmi fosfat tampon çözeltisinde (PBS)'de (pH = 7.2) süspande edilmiş ve ultrasonik titreşim sağlayan bir cihazda 360 W'de 30 dakika boyunca bekletilmiştir. Son olarak karışım 6.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir ve lipozomlar 0.22 µm'lik membranda süzülmüştür. Süzme işleminden sonra lipozomlar oda sıcaklığında kurumaya bırakılmış ve kurduktan sonra kapalı bir plastik kap içinde buzdolabında kullanım gününe kadar saklanmıştır. Uçucu yağların lipozomal yapıları Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Fizikokimya Anabilim Dalında Prof. Dr. Cemil Alkan yardımıyla hazırlanmıştır. Lipozom hazırlama görüntüleri Şekil 11'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2: Lipozom hazırlama aşamalarının görüntüleri.

Lipozomların enkapsülasyon etkinliğinin belirlenmesi

İlk önce, gaz kromatografi yöntemi ile 1 ml etanolde çözünmüş 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 ve 0.8 mg tarçın ve karanfil yağı çözeltilerinden standart bir eğri elde edilmiştir (Wen ve ark., 2010). Daha sonra, lipozomlar etanol içinde eritilmiştir ve ultrasonik bir dalgaya maruz bırakılmıştır. Daha sonra, karışım 6.000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant gaz kromatografi yöntemi ile analiz edilmek üzere uzaklaştırılmıştır. Enkapsülasyon etkinliği Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Fakültesi laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Tarçın yağı çözeltilerinden elde edilen standart eğrinin denklemi:

$$Y = -1.57408e+007+236052*X \quad R^2 = 0.9934$$

Karanfil yağı çözeltilerinden elde edilen standart eğrinin denklemi:

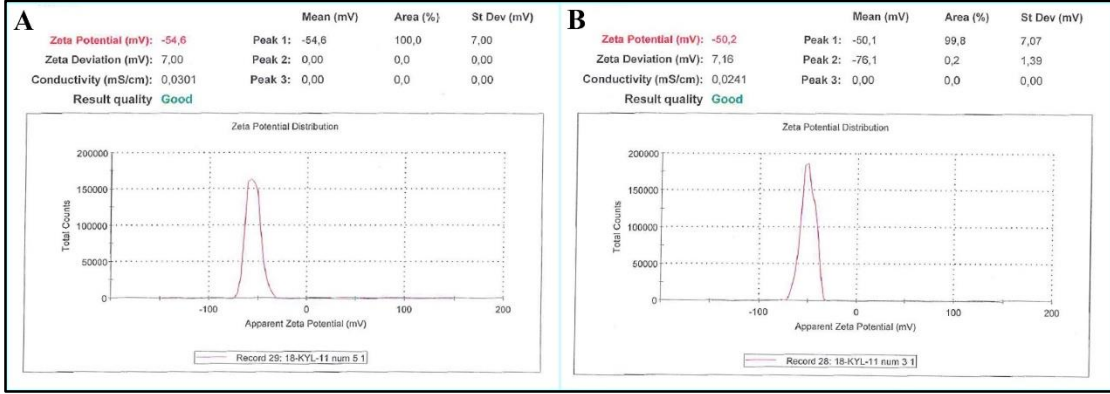
$$Y = -1.31554e+007+296822*X \quad R^2 = 0.9675$$

Kullanılan ticari tarçın yağının trans-sinamaldehit, propilen glikol, hidroksi propil eter, silan ve propanol içerdiği bulunmuştur.

Kullanılan ticari karanfil yağının öjenol, propilen glikol, silan ve propanol içerdiği bulunmuştur.

Çoklu dağılıma indeksi (PDI) ve Zeta potansiyeli

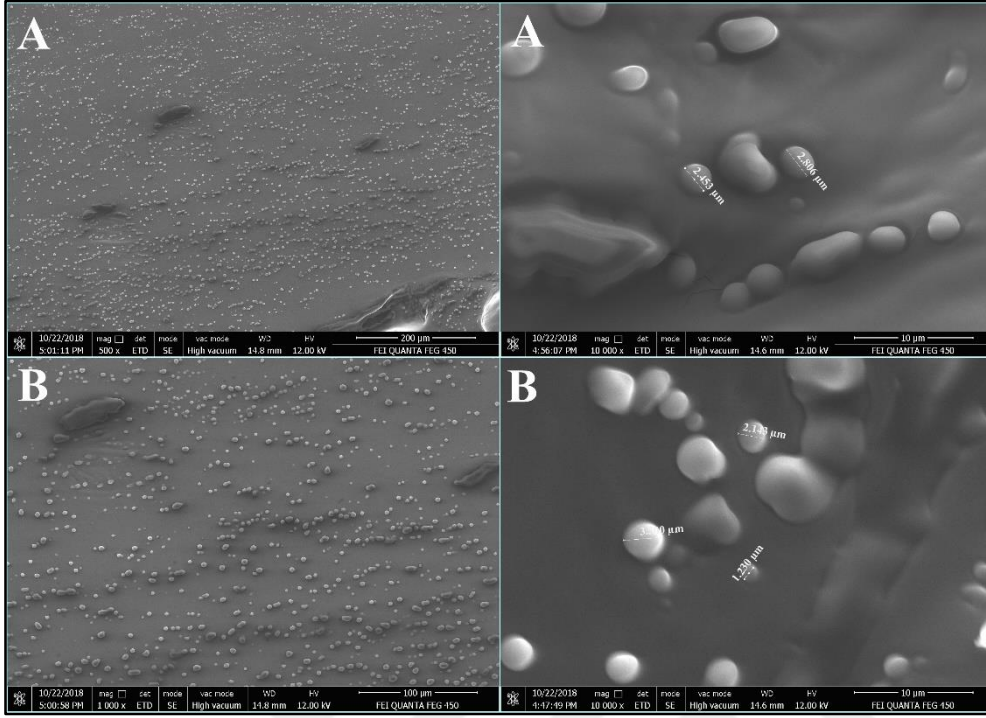
Zeta size-potansiyeli analizi, parçacık boyutu, molekül büyüklüğü, molekül ağırlığı, zeta potansiyeli, protein yükü ve reolojik özelliklerin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Song ve ark., 2014). Lipozomların zeta potansiyeli analizleri bir zetasizer cihazı (Malvern ZetaSizer Nano SZP) ile hizmet alımı olarak belirlenmiştir (Hitit Üniversitesi Bilimsel Teknik Uygulama ve Araştırma Merkezi, HUBTUAM). Parçacık büyüklüğü ve PDI, dinamik bir ışık saçılım zeta sizer ile belirlendi. Zeta potansiyeli, 25 ° C'de katlanmış kapiller hücrelerde ölçüldü ve tarçın lipozomları için -54,6 mV ve karanfil lipozomları için -50,2 olarak bulunmuştur. Lipozomların zeta potansiyeli sonuçları Şekil 12'de gösterilmiştir.



Şekil 3.3: Lipozomların zeta potansiyeli analizi sonuçları. A: Tarçın lipozom, B: Karanfil lipozom

Lipozomların tarama elektron mikroskobu (TEM) görüntülerinin alınması ve boyutlarının belirlenmesi

Numuneler, agat havanında daha homojenize bir boyut için ezilerek ince toz hale getirilmiş, karbon bant ile stap üzerine alınarak uygun vakumda altın kaplama yapılmıştır. Kaplama yapıldıktan sonra, ETD dedektörü ile SE Modda yüksek vakumda FEI QUANTA FEG450 model cihaz ile analizleri yapılmıştır. Görüntü netliği ve numune boyut açısından uygun Voltaj ve Z yüksekliklerde analizler yapılmıştır. Genel olarak toz numuneler yaklaşık olarak (elektron tabancasına) 10-20 mm yükseklikte ve elektron uygulama alan spotu görüntü çözünürlüğü açısından 1-7 aralığında 3. spot kullanılmıştır. Cihaz maksimum 30 kV Voltaj ile çalışmakta olup yapılan analizler uygun değer voltajlarda (numune için 10-15 kV) gerçekleştirilmiştir. TEM analizleri Dr. Cengiz Temiz (Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi) tarafından gerçekleştirilmiştir. Lipozomların TEM görüntüleri Şekil 13'te gösterilmiştir.



Şekil 3.4: Lipozomların TEM görüntüleri. A: Tarçın yağı lipozom, B: Karanfil yağı lipozom

### 3.1.5 Lipozom uygulanması

Çalışma gruplarından K grubuna herhangi bir uygulama yapılmamıştır. P grubuna sadece ligatür yerleştirilmiş ve *A.actinomycetemcomitans* inokulasyonu yapılmıştır. KLp grubuna ligatür yerleştirilmiş, bakteri inokulasyonu yapılmış ve karanfil yağının lipozoma hapsedilmiş formu 0.5 ml distile suya eklenerek karıştırılmış ve ince bir metal boru aracılığıyla doğrudan hayvanların midesine verilmiştir. TLp grubuna da aynı şekilde ligatür yerleştirilmiş, bakteri inokulasyonu yapılmış ve tarçın yağının lipozoma hapsedilmiş formu 0.5 ml distile suya eklenerek karıştırılmış ve ince bir metal boru aracılığıyla doğrudan hayvanların midesine verilmiştir. Her sıçana uygulanan günlük karanfil uçucu yağı lipozomu, 25 mg/kg karanfil uçucu yağı içermek üzere ayarlanmıştır. Her sıçana uygulanan günlük tarçın uçucu yağı lipozomu ise 75 mg/kg tarçın uçucu yağı içermek üzere ayarlanmıştır.

### **3.2 Sakrifikasyon**

Çalışmanın 15. gününde anestezi altında tüm sıçanlar 200 mg/kg i.p. pentotal sodyum (Ekipental, Tümekip İlaç San, İstanbul, Türkiye) enjeksiyonu ile sakrifiye edildi ve sıçanların alt çeneleri çıkarıldı. Çıkarılan çeneler %10'luk formaldehit solüsyonunda fikse edildi ve stereomikroskop (Carl Zeiss, Oberkochen, Almanya) ile x16 büyütme altında incelendi. Çeneler daha sonra histolojik doku takibi aşamalarına tabi tutuldu.

### **3.3 Stereomikroskop ile Çenelerde Kemik Kaybının İncelenmesi**

Sakrifikasyondan sonra çıkarılan çeneler stereomikroskop (Carl Zeiss, Oberkochen, Almanya) ile 16x büyütme altında incelendi. Stereomikroskoba entegre kamera ve bilgisayar programı yardımıyla (Axiovision, Carl Zeiss, Oberkochen, Almanya) çenelerin standardize fotoğrafları alındı. Fotoğraf üzerinde çene kemiğindeki yıkım alanları mesafe ve alan ölçümü ile belirlendi. Alveol kemik kaybının ölçümü için mandibulalar metilen mavisi ile boyandı. Metilen mavisi kemik ve diş dokularının ayrımını kolaylaştıran ve doku yapısını etkilemeyen bir boyadır. Boyama sonrasında mine sement sınırı alveol kret tepesi arasındaki mesafe ölçülerek kaydedildi. Ölçümler bittikten sonra çeneler akan su altında yıkanarak metilen mavisi boya uzaklaştırıldı.

### **3.4 Histolojik İnceleme**

Sağ çeneler % 10 nötral tamponlu formalinde sabitlendikten sonra, demineralizasyon işlemi tamamlanana kadar 10 hafta boyunca haftada iki kez etilendiamintetraasetik asit içeren fiksatif-eklenmiş bir dekalsifikasyon çözeltisinde (GBL Co., İstanbul, Türkiye) bekletildi. Dekalsifikasyon sonrasında, örnekler farklı konsantrasyonlarda etanol serileri ile dehidrate edildi. Sonrasında ksilen ile şeffaflaştırıldı ve parafine gömüldü. Histolojik analizler, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji laboratuvarında Doç. Dr. Fikret Gevrek tarafından yapıldı. Parafine gömülmüş örneklerden 5 µm seri kesitler alındı ve hematoksilin-eozin (HE) ve immünohistokimya

boyama işlemleri gerçekleştirildi. Tüm histolojik değerlendirmeler ışık mikroskobu ile (Nikon, Tokyo, Japonya) gerçekleştirildi.

Osteoblast ve inflamatuvar hücreler için hematoksilin-eozin boyası uygulandı. Osteoklast hücreleri için asit fosfataz (TRAP) enzim boyası uygulandı. Ayrıca çene kemiklerindeki kemik yapım ve yıkımını değerlendirebilmek için kesitler kemik yapım ve yıkım göstergeleri olan OPG ve RANKL ve enflamasyon göstergeleri olan iNOS ve COX-2 tespiti için immünohistokimya ile boyandı. Histolojik kesitlerde mandibular birinci molar dişin mesial ve distal kısmında periodontal dokuların koronal yarısı incelendi.

#### **3.4.1 Osteoblast hücresi sayımı**

Kemik yapan osteoblast hücreleri kübik şekilli hücrenin merkezinde yuvarlak bir çekirdeği olan ve kemik yüzeyi ile temas halinde olan sıra halinde dizilmiş hücreler olarak gözlendi. Osteoit ile sınırlandırılmış ve periodontal ligamente komşu olan kübik şekilli hücreler aktif osteoblast hücreleri olarak kabul edildi. Bilgisayar ekranında hücre sayımı için bilgisayar ve ışık mikroskobuna bütünleşmiş bir program ile (NIS Elements, Nikon Instruments Europe BV, Amsterdam, Hollanda) x1000 büyütme altında 10000  $\mu\text{m}^2$ 'lik bir sayım çerçevesi çizildi ve çerçevenin içindeki osteoblast hücreleri sayıldı. Sayımlar üç farklı yerden yapıldı ve üç sayımın ortalaması o hayvanın osteoblast sayısı olarak kaydedildi.

#### **3.4.2 Enflamatuvar hücre sayımı**

Enflamatuvar hücre sayımı için periodontal ligamentin mesial ve distal bölgelerinin koronal yarısı incelendi ve osteoblast hücresi sayımı ile aynı şekilde x1000 büyütmede 10000  $\mu\text{m}^2$ 'lik bir çerçeve çizildi. Bu alandaki enflamatuvar hücreler (nötrofil, makrofaj, lenfosit, eozinofil ve plazma hücreleri) sayıldı. Sayımlar üç farklı noktadan yapıldı ve bu üç ölçümün ortalaması hayvanın enflamatuvar hücre sayısı olarak



kaydedildi. Hücreler aynı program aracılığıyla sayıldı (NIS Elements, Nikon Instruments Europe BV, Amsterdam, Hollanda).

### **3.4.3 TRAP enzim boyaması**

Deparafinize edilmiş kesitler, TRAP enzimi üreten aktif osteoklastları tanımlamak için literatürde belirtilen yöntemle TRAP boyamasına tabi tutuldu (Balci ve ark., 2019; Balci Yuce ve ark., 2018). İlk önce örnekler alkolde rehidrate edildi ve sonrasında 0.2 M asetat tamponu, 0.2 M sodyum asetat çözeltisi ve sodyum tartrat dibazik dehidrat içeren bir sıvı çözeltiye konuldu. Oda sıcaklığında 20 dakikalık inkübasyondan sonra, naftol AS-MX fosfat ve fast red boyası eklendi ve ardından 37°C'de 1 saat inkübasyon yapıldı. TRAP-pozitif osteoklastlar parlak kırmızı renk alınca kadar inkübasyon devam etti. Parlak kırmızı boyama gözlendiğinde kesitler deiyonize su ile yıkandı ve hematoksilen ile zıt boyama yapıldı. Bir lakuna içinde kemiğe temas eden dev çok çekirdekli hücreler osteoklast olarak kabul edildi ve sayıldı. Osteoklast hücre sayımı mandibuler molar dişin mesial ve distal bölgelerinin koronal yarısından yapıldı. Sayımlar 3 kez tekrarlandı ve ortalamaları kaydedildi.

### **3.4.4 İmmünohistokimya boyaması**

Kesitler ilk önce 37°C'de 2 saat bekletildi ve parafin uzaklaştırıldı. Daha sonra sırasıyla ksilen ve alkolle muamele edildikten sonra, endojen peroksidaz aktivitesini baskılamak için %3'lük hidrojen peroksitte bekletildi. 30 dakika boyunca serum ile inkübasyondan sonra, örnekler gece boyunca primer antikorlarla inkübe edildi. Kullanılan antikorlar ve derişimleri: poliklonal anti-iNOS antikor (1: 100, Abcam, Cambridge, İngiltere), anti-OPG antikor (1:100, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD), anti-RANKL antikor (1:100, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD) ve anti-COX-2 (1:100, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD). İnkübasyondan sonra kesitler 3 kez 5'er dakika fosfat tampon solüsyon ile yıkandı ve sonrasında 30 dakika süresince biyotinlenmiş immünoglobulin G sekonder antikor ile inkübe edildi. Bu inkübasyon sonrasında da beşer dakikalık 3 yıkama sonrasında 30 dakika boyunca streptavidin-

horseradish peroksidaz konjuge reaktif ile reaksiyona konuldu. Yine 3x5 yıkama sonrasında immünoaktiviteyi görülmesi için örnekler AEC kromojenle inkübe edildi. Kesitlere daha sonra hematoksilin ile zıt boyama yapıldı ve boyamalar dijital bir program (NIS Elements, Nikon Instruments Europe BV, Amsterdam, Hollanda) ve ışık mikroskobu kullanılarak analiz edildi (Nikon, Tokyo, Japonya).

### **3.4.5 İmmünohistokimya boyama değerlendirilmesi ve H skoru hesaplama**

1000x büyütme ışık mikroskobu altında incelenecek her bir hayvana ait kesitlerde alt çene birinci azı diş çevresinden beş alan seçildi. Her kesitte mandibuler birinci molar dişin mesial ve distalindeki periodontal ligament ve alveol kemik alanlarındaki hücreler boyanma durumlarına göre sayıldı. Bu bölgelerdeki hücrelerin sayımı, immün boyama yoğunluğuna göre yapıldı. 10000 µm<sup>2</sup>'lik bir sayım çerçevesi alanındaki tüm hücreler, boyama yoğunlukları dikkate alınarak sayıldı. Bu sayımlar sırasında, hem pozitif immünoaktivite gösteren hücrelerin sayısı hem de bu hücrelerin immünoaktif yoğunluk dereceleri ve boyanmayan tüm hücreler de dikkate alındı. Boyanma skorlamasında boyama olmaması '0', hafif boyama yoğunluğu '1', orta seviyede boyama yoğunluğu '2' ve yüksek boyama yoğunluğu '3' olarak değerlendirildi. İncelenen beş alanın ortalaması alındı. Sayımların sonuçlarını sayısal bir değere dönüştürmek için, histoloji skoru (H Skor) formülü  $[\sum P_i (i + 1)]$  kullanıldı (Karatas ve ark., 2019). Bu formülde, i: boyama yoğunluğu skorunu ve P<sub>i</sub>: boyanan hücrelerin yüzdesini ifade etmektedir. Bu işlem RANKL, OPG, iNOS ve COX-2 için ayrı ayrı gerçekleştirildi.

### **3.5 İstatistiksel Değerlendirme**

Çalışmadaki tüm veriler bir istatistik analiz programı ile (IBM SPSS, New York, ABD) ile analiz edildi. İlk olarak tüm verilerde varyansların homojenlik testi Bartlett testi ile gerçekleştirildi. Parametrik varsayımları yerine getiren veriler için ikiden çok bağımsız grup ortalamalarının karşılaştırmasında One-Way ANOVA ve çoklu karşılaştırmalar için Tukey testi kullanıldı. Parametrik varsayımları yerine getirmeyen iki ve ikiden çok bağımsız gruplar için Mann Whitney U ve Kruskal Wallis testleri kullanıldı.

Parametrelerden osteoklast sayısı ve osteoblast sayısı, için Mann Whitney U ve Kruskall Wallis testleri kullanıldı. Kemik kaybı alanı, kemik kaybı mesafesi, inflamatuvar hücre sayısı, iNOS ve COX-2, RANKL ve OPG seviyeleri için ise One-Way ANOVA ve Tukey testi kullanıldı. Yanılma düzeyi 0.05 olarak alınarak istatistiksel değerlendirmeler gerçekleştirildi.

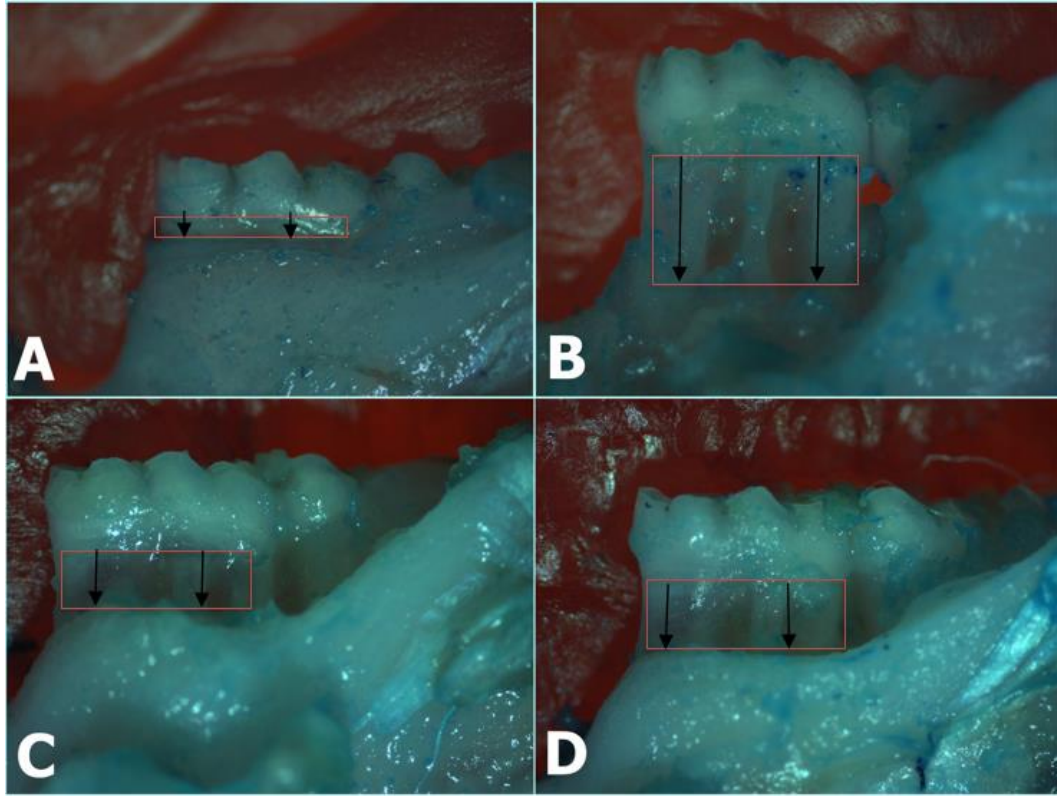


## 4. BULGULAR

Tüm çalışma gruplarında çalışma süresince herhangi bir komplikasyon oluşmadı ve sıçanlarda deneysel periodontitis başarılı bir şekilde oluşturuldu.

### 4.1 Çenelerin Stereomikroskop Altında İncelenmesi

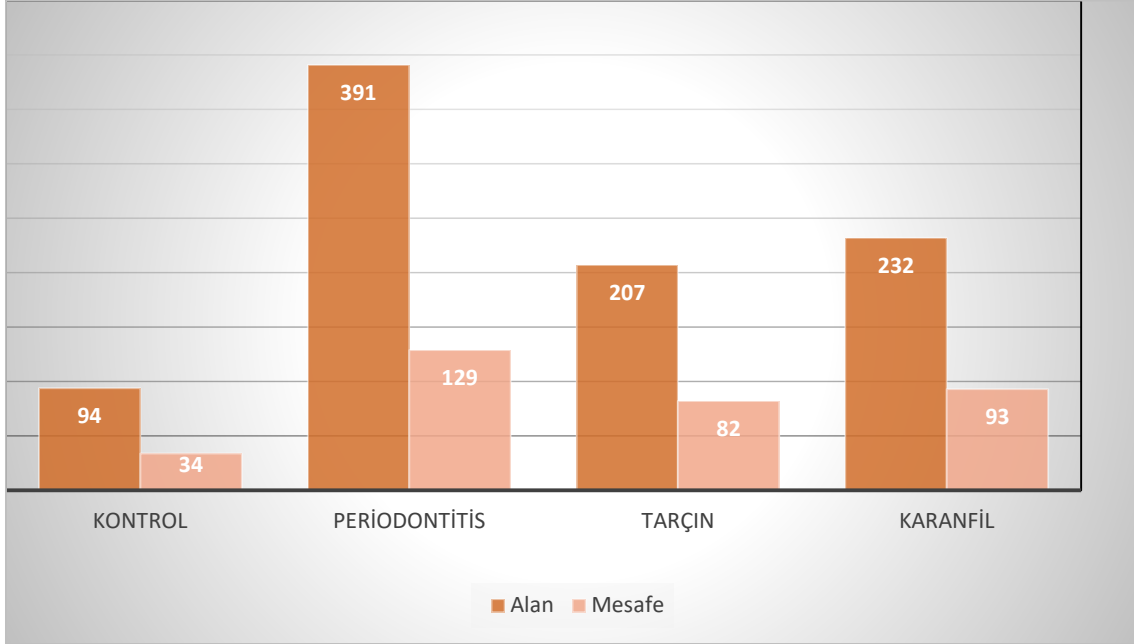
Hayvanlarda dişeti hastalığına bağlı olarak oluşan kemik kaybı iki şekilde ölçüldü. Birincisi, dişin mine-sement sınırının başladığı yerden itibaren kemiğin en üst sınırına kadar olan mesafenin ölçümü olarak gerçekleştirildi. İkincisi ise bu mine-sement sınırı, kemiğin üst sınırı, dişin mesiyal ve distal sınırları arasında kalan dikdörtgenimsi alanın alan ölçümü şeklinde yapıldı (Şekil 14). Mesafe ve alan ölçümleri karşılaştırıldığında hastalık oluşturulmamış olan kontrol sıçanlarında bu mesafe ve alan diğer gruplardaki hayvanlara oranla anlamlı düzeyde düşük bulundu ( $p=0.004$ ). Tedavi edilmemiş periodontitis grubunda kemik kaybı alan ve mesafesi diğer gruplara oranla anlamlı ölçüde yüksek bulundu. Gruplara ait kemik kaybı karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edildi ( $p=0.001$ ). Kontrol grubunda herhangi bir kemik kaybı gözlenmedi. Periodontitis grubunda alveol kemik kaybı diğer gruplardan anlamlı düzeyde fazlaydı ( $p=0.02$ ). Tarçın ve karanfil uçucu yağı uygulaması deneysel periodontitise bağlı olarak gözlenen yıkımı önemli düzeyde azalttı ( $p=0.03$ ). Ayrıca, tarçın ve karanfil uçucu yağı lipozomlarının kemik yıkımını önlemedeki etkileri benzer bulundu ( $p=0.06$ ). Çalışma gruplarında kemik kaybı mesafesi ve alan ölçümleri ortalamaları Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1 ve Şekil 4.2’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1: Alveol kemik kaybı ölçümleri. Gruplarda çenelerdeki alveol kemik mesafesi ve alanı ölçümünün temsili görüntüleri gösterilmiştir. Siyah oklar ölçülen kemik mesafesini, kırmızı çerçeve ise ölçülen kemik kayıp alanını işaret etmektedir. A: Kontrol grubu, B: Periodontitis grubu, C: Tarçın grubu, D: Karanfil grubu

Çizelge 4.1: Gruplarında kemik kaybı mesafe ve alan ölçümleri. Üstsimge olarak ifade edilen farklı harfler istatistiksel farklılığı ifade etmektedir. test1: One Way ANOVA-Tukey

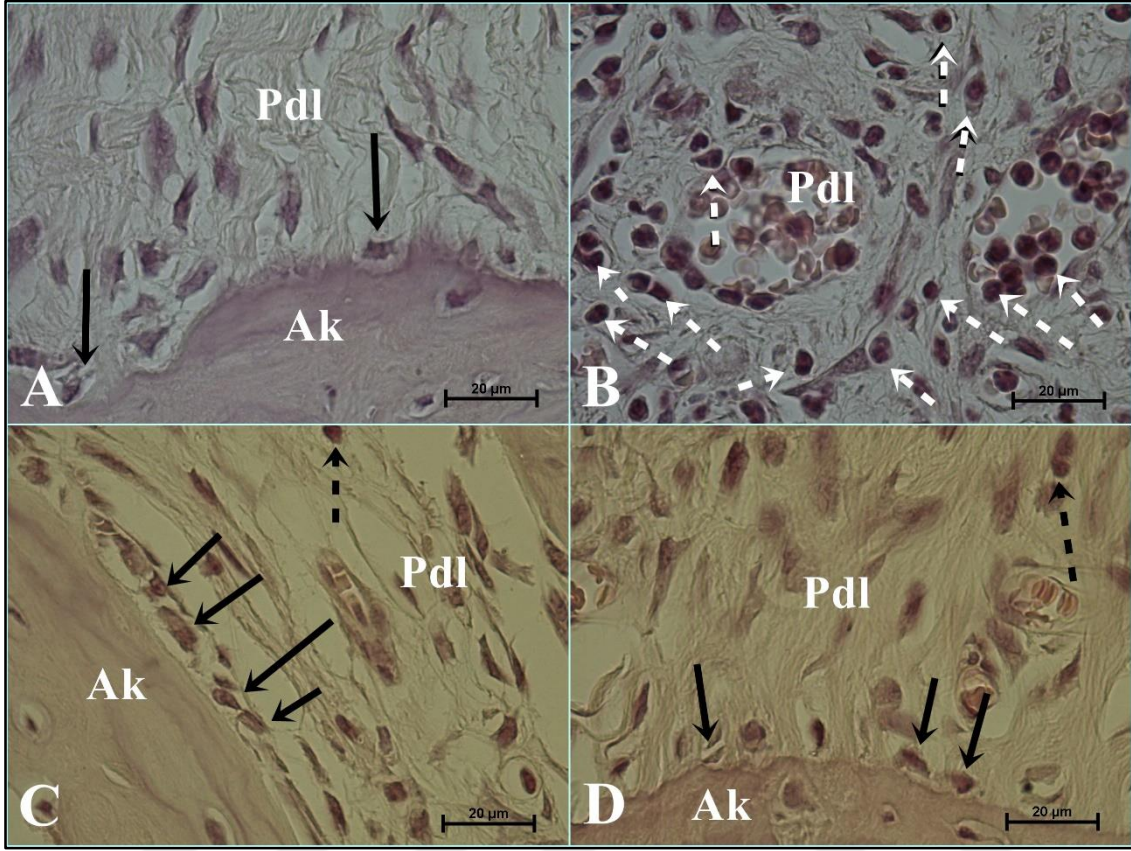
Çalışma grupları/ Çalışma parametreleri	Kontrol grubu	Periodontitis grubu	Tarçın grubu	Karanfil grubu	p değeri
Kemik kaybı alanı ölçümü	94.66±13.17 <sup>a</sup>	391.83±193.77 <sup>b</sup>	207.12±32.24 <sup>c</sup>	232.12±14.98 <sup>c</sup>	0.01 test1
Kemik kaybı mesafesi ölçümü	34.66±3.26 <sup>a</sup>	129.83±60.16 <sup>b</sup>	82.00±3.29 <sup>c</sup>	93.62±9.53 <sup>c</sup>	0.001 test1



Şekil 4.2 Çalışma gruplarında kemik kaybı alan ve mesafe ölçümleri

#### 4.2 Histolojik Bulgular

Histolojik kesitler periodontal ligamentteki enflamatuvar hücre sayısı ve alveol kemikteki osteoblast ve osteoklast sayıları açısından ışık mikroskobu altında incelendi. Çalışma gruplarının ortalama enflamatuvar hücre, osteoblast ve osteoklast sayıları Çizelge 4.2’de gösterilmiştir. Çalışma gruplarında periodontal ligament ve alveol kemiğin temsili histolojik kesit görüntüleri Şekil 4.3’te gösterilmiştir.

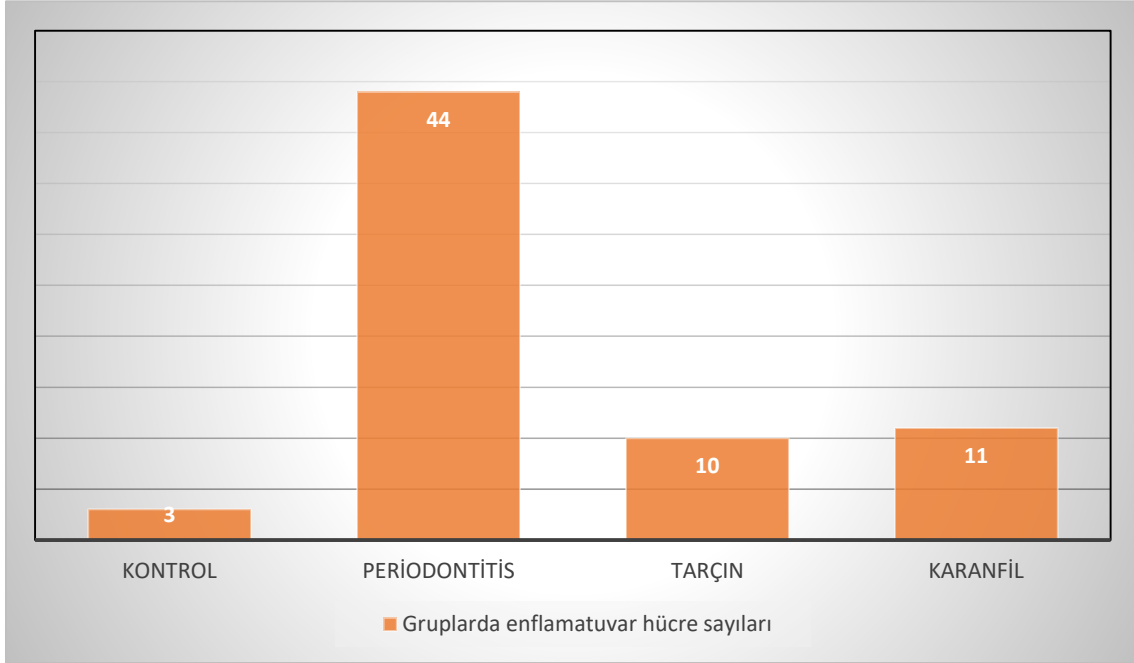


Şekil 4.3: Çalışma gruplarında temsili histolojik kesit görüntüleri. Siyah düz oklar osteoblast hücrelerini, siyah ve beyaz kesikli oklar enflamatuvar hücreleri işaret etmektedir. Ak: Alveol kemik, Pdl: Periodontal ligament. A: Kontrol grubu, B: Periodontitis grubu, C: Tarçın grubu, D: Karanfil grubu.

#### Gruplarda periodontal ligamentteki ortalama enflamatuvar hücre sayıları

Alt çene sağ birinci molar dişin periodontal ligamentinin koronal yarısı mesial ve distal açılardan ışık mikroskobunda 1000X büyütmede incelendi. Hücre sayımı için ekranda çevresi 10000  $\mu\text{m}^2$  olan bir çerçeve oluşturuldu ve bu çerçevenin içinde kalan hücreler bilgisayar programı yardımıyla sayıldı (NIS elements, Nikon, Japonya). Enflamatuvar hücreler olarak periodontal ligamentte bulunan, nötrofil, makrofaj, T lenfositler, plazma hücreleri, eozinofil ve mast hücrelerinin sayıları belirlendi. Hücrelerin ayrımı morfolojik olarak yapıldı. Gruplar arasında en düşük enflamatuvar hücre sayısı kontrol grubunda gözlenirken en yüksek sayılar periodontitis grubunda gözlenmiştir. Tarçın ve karanfil uçucu yağ gruplarında enflamatuvar hücre sayısı periodontitise oranla anlamlı düzeyde düşük bulunurken kontrol grubuna oranla anlamlı düzeyde yüksek

bulunmuştur. Ek olarak, tarçın ve karanfil grupları karşılaştırıldığında da, enflamatuvar hücre sayıları istatistiksel olarak benzer bulunmuştur ( $p=0.06$ ). Çalışma gruplarındaki enflamatuvar hücre sayıları Şekil 4.4'te gösterilmiştir.



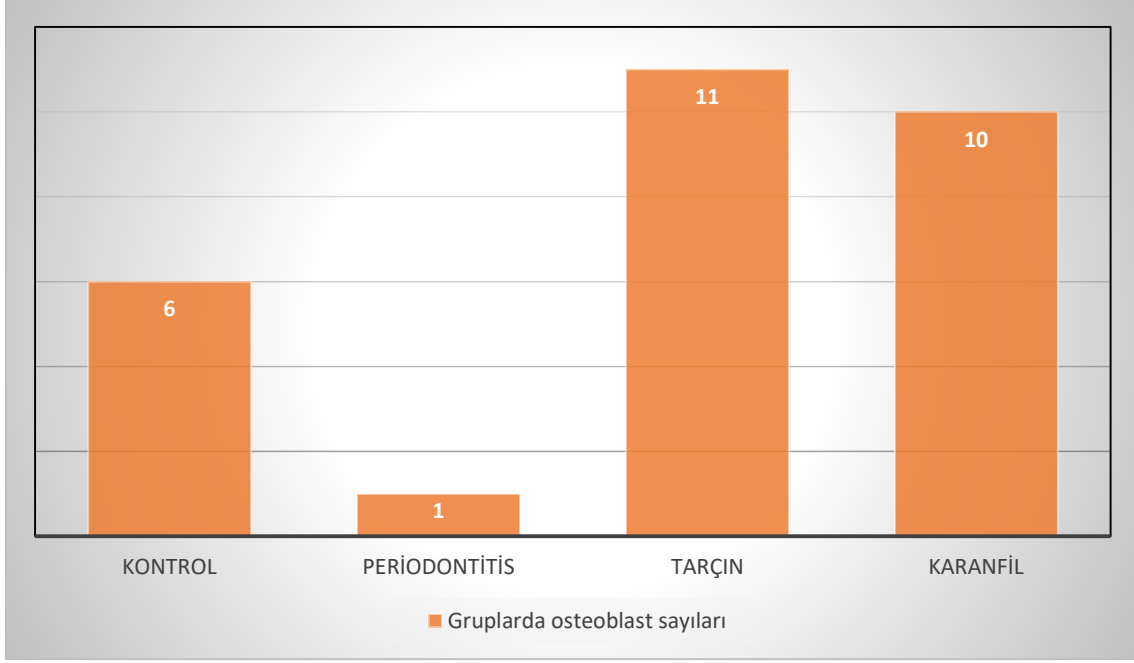
Şekil 4.4: Çalışma gruplarında ortalama enflamatuvar hücre sayıları

#### Gruplarda alveol kemikteki ortalama osteoblast sayıları

Alt çene sağ birinci molar dişin periodontal ligamentinin koronal yarısına komşu olan alveol kemik mesial ve distal açılardan ışık mikroskobunda 1000x büyütmede incelendi. Hücre sayımı için ekranda çevresi 10000  $\mu\text{m}^2$  olan bir çerçeve oluşturuldu ve bu çerçevenin içinde kalan hücreler bilgisayar programı yardımıyla sayıldı (NIS elements, Nikon, Japonya). Alveol kemik yüzeyinde bulunan, kübik bir hücresel forma sahip olan hücreler aktif osteoblastlar olarak dikkate alındı ve sayıldı. Alveol kemik yüzeyindeki kübik forma sahip olmayan yassı hücreler 'surface lining cell' adı verilen osteosite dönüşmekte olan aktif olmayan hücreler olduğundan sayıma dâhil edilmedi. Gruplarda osteoblast hücreleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı düzeyde farklılık tespit edildi ( $p=0.001$ ). En düşük osteoblast sayısı periodontitis grubunda bulunurken en yüksek osteoblast sayısı kontrol grubunda gözlemlendi. Tarçın ve



karanfil gruplarındaki sayılar periodontitis grubuna oranla anlamlı ölçüde yüksek bulunurken, kontrol grubuna oranla anlamlı ölçüde düşük bulundu. Bu gruplar birbirleri ile karşılaştırıldığında ise, herhangi bir anlamlı farka rastlamadı ( $p=0.08$ ). Gruplarda osteoblast sayıları Şekil 4.5'te gösterilmiştir.

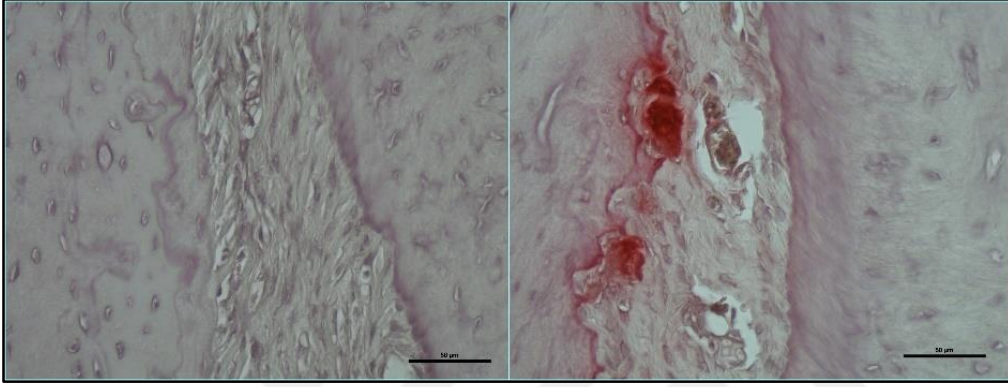


Şekil 4.5: Çalışma gruplarında ortalama osteoblast sayıları

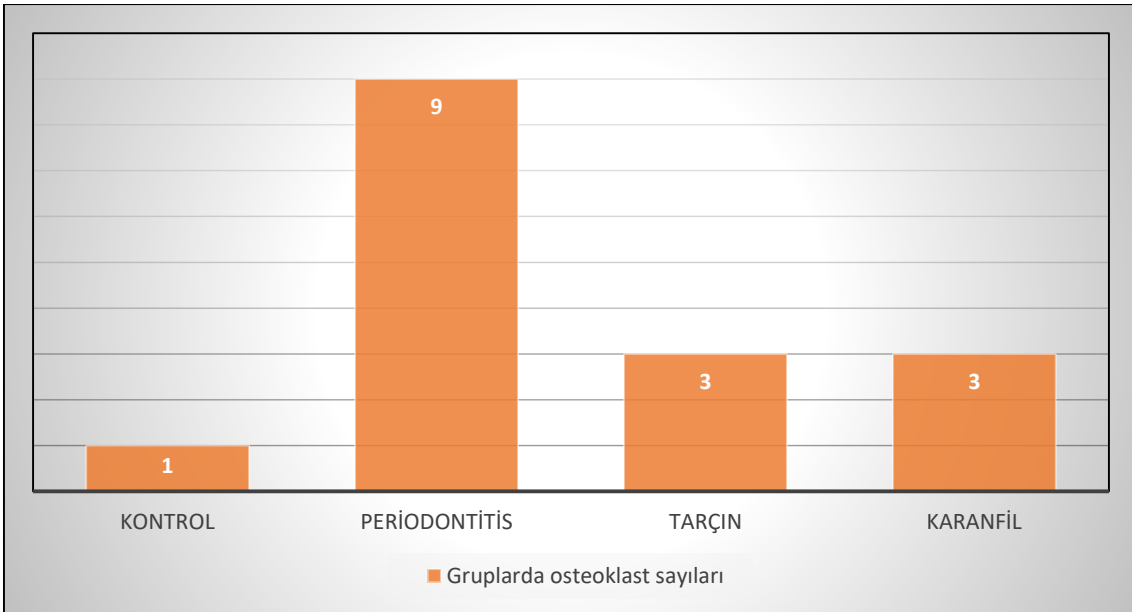
#### Gruplarda alveol kemikteki ortalama osteoklast sayıları

Osteoklast hücreleri histolojik kesitlerde tartrat dirençli asit fosfataz boyası ile boyandıktan sonra sayıldı. Alt çene sağ birinci molar dişin periodontal ligamentinin koronal yarısına komşu olan alveol kemik mesial ve distal açılardan ışık mikroskopunda 400x büyütmede incelendi. Kemik yüzeyinde lakünalar olarak ifade edilen oyuklarda bulunan çok çekirdekli dev hücreler aktif osteoklast hücreleri olarak dikkate alındı ve sayıldı. Tartrat dirençli asit fosfataz osteoklastların açık kırmızı renkte görülmelerini sağlayarak hücrelerin ayırt edilmesini ve sayımını kolaylaştırdı. Tartrat dirençli asit fosfataz boyama görüntüleri Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Gruplarda ortalama osteoklast hücre sayıları karşılaştırıldığında en düşük osteoklast sayısı kontrol grubunda tespit edilirken en yüksek osteoklast sayıları periodontitis grubunda tespit edildi. Tarçın ve

karanfil gruplarında periodontitise oranla anlamlı düzeyde düşük osteoklast sayısı bulunurken bu sayılar kontrol grubu sayılarına oranla anlamlı düzeyde yüksek bulundu ( $p=0.01$ ). Tarçın ve karanfil grupları karşılaştırıldığında ise herhangi bir fark gözlenmedi ( $p=0.22$ ). Çalışma gruplarında ortalama osteoklast sayıları Şekil 4.7’de gösterilmiştir.



Şekil 4.6: Sağlıklı ve hastalıklı sıçanlarda periodontal dokular. Soldaki kesit görüntüsü kontrol grubuna aitken, sağdaki kesit görüntüsü periodontitis grubuna aittir. Kırmızı ile boyanan hücreler osteoklast hücreleridir.



Şekil 4.7: Çalışma gruplarında ortalama osteoklast sayıları

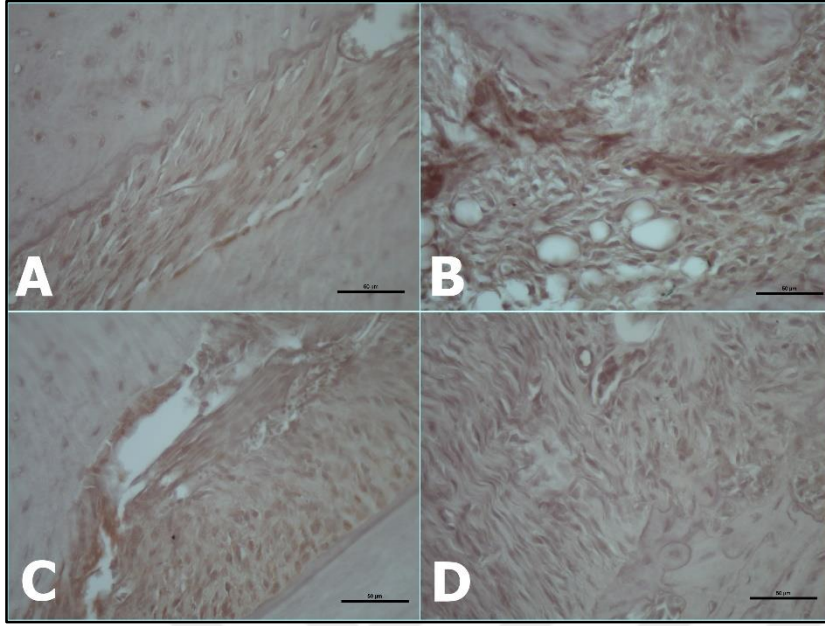
Çizelge 4.2: Gruplarda enflamatuvar hücre, osteoblast ve osteoklast sayıları. Üstsimge olarak ifade edilen farklı harfler istatistiksel farklılığı ifade etmektedir. test1: One Way ANOVA- Tukey, test2: Mann Whitney U-Kruskal Wallis

Çalışma grupları/ Çalışma parametreleri	Kontrol grubu	Periodontitis grubu	Tarçın grubu	Karanfil grubu	p değeri
<b>İnflamatuvar hücre sayıları</b>	2.96±0.78 <sup>a</sup>	44.30±6.76 <sup>b</sup>	10.75±1.68 <sup>c</sup>	11.50±1.93 <sup>c</sup>	0.000 test1
<b>Osteoblast hücre sayıları</b>	6.21±2,11 <sup>a</sup> Min- Max:10-13 Median:10	1.10±0.50 <sup>b</sup> Min-Max:0-2 Median:0	11.59±1.35 <sup>c</sup> Min-Max:2-5 Median:4	10.41±0.59 <sup>c</sup> Min-Max:4-6 Median:6	0.000 test2
<b>Osteoklast hücre sayıları</b>	1.00±0.25 <sup>a</sup> Min-Max:0-1 Median:0	9.50±0.44 <sup>b</sup> Min-Max:4-6 Median:4	3.05±0.57 <sup>c</sup> Min-Max:1-2 Median:2	3.20±0.30 <sup>c</sup> Min-Max:0-2 Median:1	0.000 test2

### 4.3 İmmünohistokimya Sonuçları

Gruplarda RANKL seviyeleri

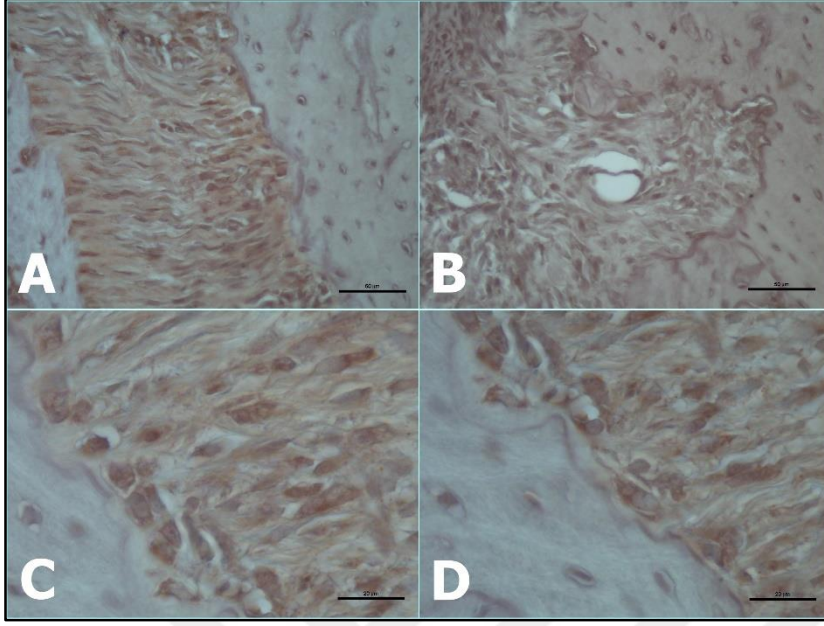
Çalışma gruplarındaki RANKL ekspresyonları karşılaştırıldığında en düşük seviye kontrol grubunda gözlenirken en yüksek seviye periodontitis grubunda gözlenmiştir. RANKL osteoklastların farklılaşmasını ve aktivasyonunu sağladığı için yüksek seviyeleri kemik kaybını işaret ederken düşük seviyeleri kemik kaybı olmadığını veya daha düşük seviyede olduğunu göstermektedir. Tarçın ve karanfil gruplarında RANKL seviyeleri istatistiksel olarak benzer bulunmuştur (p=0.8) ve seviyeler kontrole oranla daha yüksek bulunurken (p=0.01 tarçın, p=0.01 karanfil), periodontitise oranla önemli ölçüde düşüş göstermiştir (p=0.001 tarçın, p=0.001 karanfil). Histolojik kesitlerde RANKL boyanması Şekil 4.8'de gösterilmiştir.



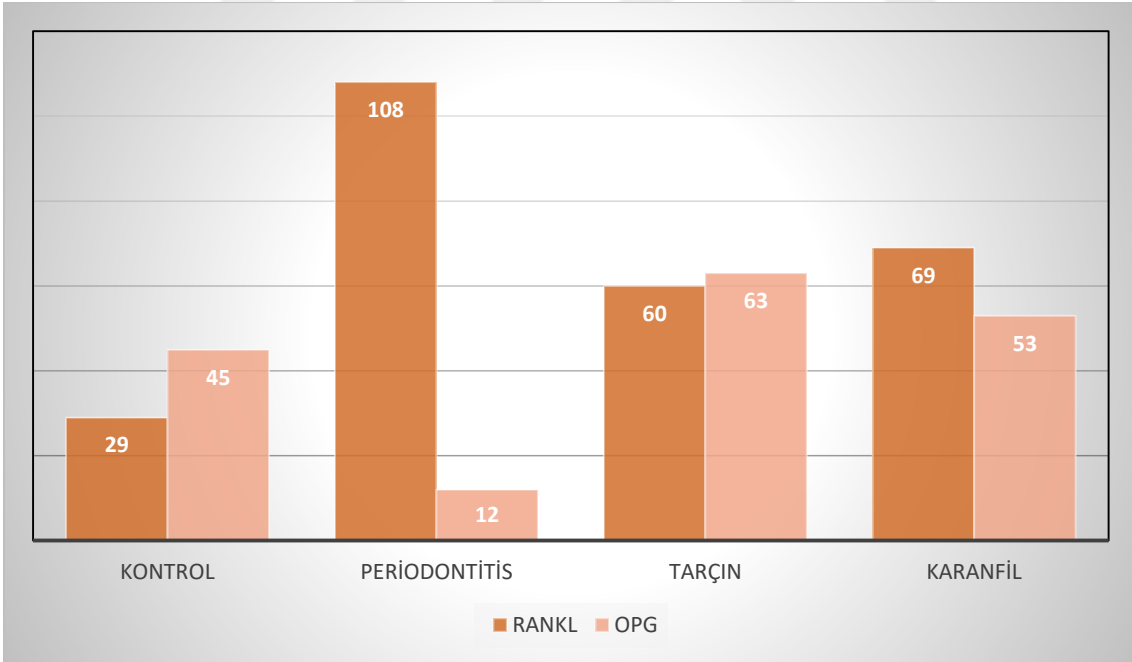
Şekil 4.8: Gruplarda temsili RANKL boyama görüntüleri. A: Kontrol grubu, B: Periodontitis grubu, C: Tarçın grubu ve D: Karanfil grubu.

#### Gruplarda OPG seviyeleri

OPG, RANKL ile aynı reseptöre yarışmalı olarak bağlanmakta ve osteoklastik farklılaşma ve aktivasyonunu engellemektedir. Bu nedenle OPG seviyeleri ile RANKL seviyeleri arasında genellikle bir ters orantı bulunmaktadır. Gruplarda OPG ekspresyon seviyeleri RANKL seviyelerine oranla zıt bir model sergilemiştir. En düşük OPG seviyeleri periodontitis grubunda gözlenmiştir. Kontrol grubundaki seviyeler periodontitise oranla daha yüksek bulunurken tarçın ve karanfile oranla daha düşük bulunmuştur. Tarçın ve karanfil grupları periodontitis ve kontrol gruplarına oranla anlamlı ölçüde yüksek OPG seviyeleri göstermişlerdir ( $p=0.01$ ). Ek olarak OPG seviyeleri tarçın ve karanfil gruplarında istatistiksel olarak benzer bulunmuştur ( $p=0.3$ ). Histolojik kesitlerde OPG boyanması Şekil 4.9'da gösterilmiştir. Gruplarda RANKL ve OPG seviyeleri Şekil 4.10'da gösterilmiştir.



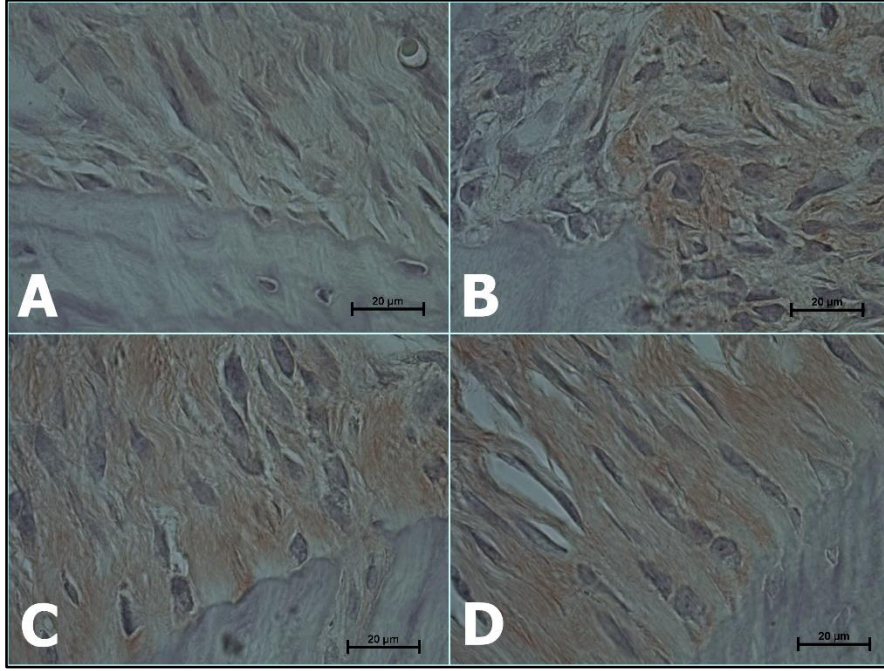
Şekil 4.9: Gruplarda temsili OPG boyama görüntüleri. A: Kontrol grubu, B: Periodontitis grubu, C: Tarçın grubu ve D: Karanfil grubu.



Şekil 4.10: Çalışma gruplarında ortalama RANKL ve OPG H skorları

### Gruplarda iNOS seviyeleri

iNOS birçok enflamatuvar olaya aracılık eden önemli bir düzenleyicidir ve yüksek seviyeleri genellikle enflamasyon şiddetini işaret etmektedir. Bu araştırmada en yüksek iNOS seviyeleri periodontitis grubunda bulunurken en düşük seviyeler kontrol grubunda bulundu ( $p=0.01$ ). Tarçın ve karanfil gruplarında iNOS düzeyleri kontrole oranla daha yüksek tespit edilirken, periodontitis grubuna oranla daha düşük bulundu ( $p=0.03$ ). Hem tarçın hem de karanfil bir enflamasyon göstergesi olan iNOS düzeyinden anlamlı düşme sağladı. Histolojik kesitlerde iNOS boyanması Şekil 4.11’de gösterilmiştir.



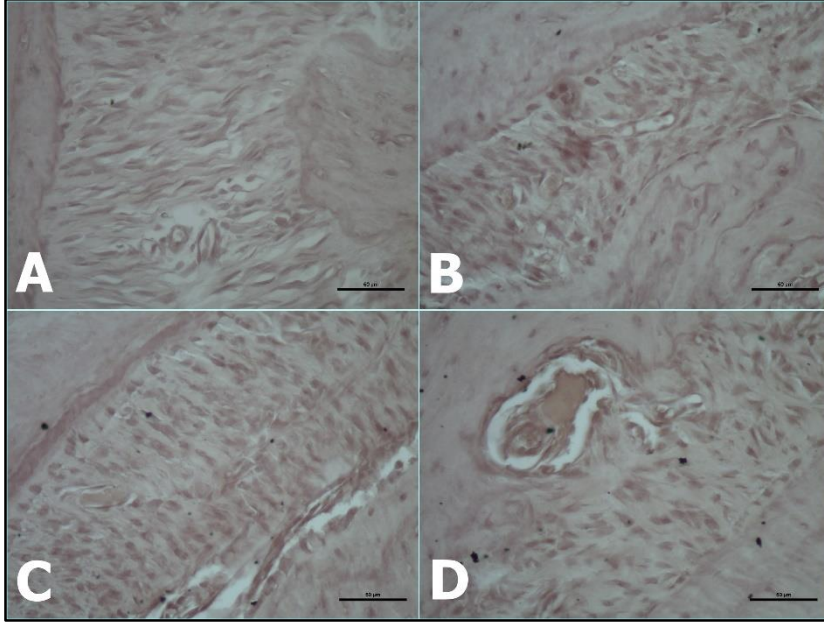
Şekil 4.11: Gruplarda temsili iNOS boyama görüntüleri. A: Kontrol grubu, B: Periodontitis grubu, C: Tarçın grubu ve D: Karanfil grubu.

### Gruplarda COX-2 seviyeleri

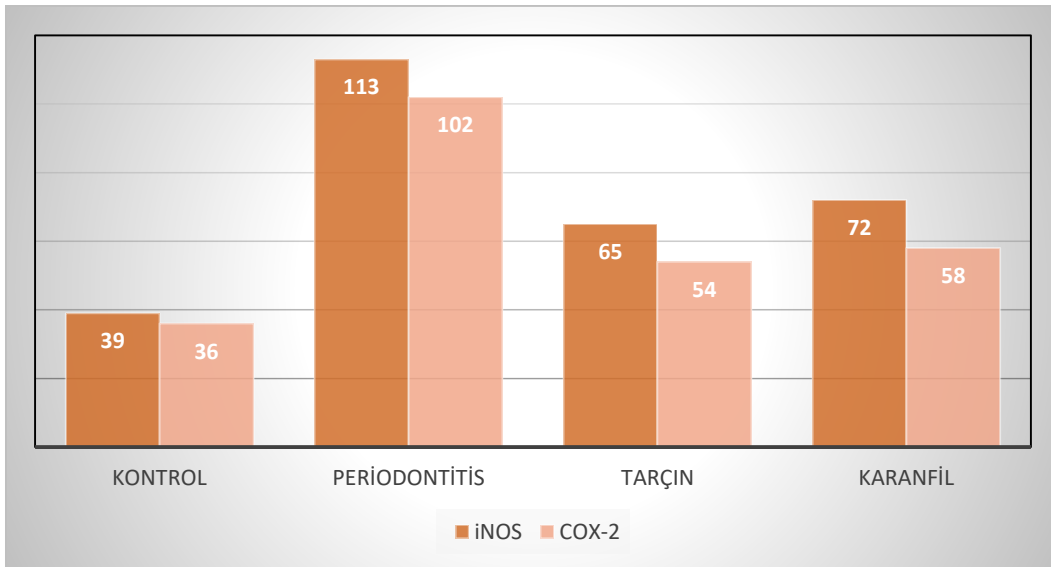
COX-2 enflamatuvar olayların en önemli göstergelerinden biridir ve seviyeleri doğrudan enflamasyon şiddeti ile orantılı olarak değişmektedir. En düşük COX-2 seviyeleri kontrol grubunda gözlenirken en yüksek COX-2 seviyeleri periodontitis grubunda gözlemlendi. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu.



( $p=0.001$ ). Tarçın ve karanfil uçucu yağ lipozom uygulaması COX-2 seviyelerinde periodontitis grubuna oranla önemli ölçüde azalma sağladı ( $p=0.01$ ) ancak seviyeler kontrol seviyesinden daha yüksek bulundu ( $p=0.01$ ). Histolojik kesitlerde COX-2 boyanması Şekil 4.12’te gösterilmiştir. Gruplarda iNOS ve COX-2 seviyeleri Şekil 4.13’te gösterilmiştir.



Şekil 4.12: Gruplarda temsili COX-2 boyama görüntüleri. A: Kontrol grubu, B: Periodontitis grubu, C: Tarçın grubu ve D: Karanfil grubu.



Şekil 4.13: Çalışma gruplarında ortalama iNOS ve COX-2 H skorları

Çalışma gruplarında RANKL, OPG, iNOS ve COX-2 seviyeleri Çizelge 4.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.3: Gruplarda RANKL, OPG, iNOS ve COX-2 seviyeleri. Üstsimge olarak ifade edilen farklı harfler istatistiksel farklılığı ifade etmektedir. test1: One Way ANOVA- Tukey

Çalışma grupları/ Çalışma parametreleri	Kontrol grubu	Periodontitis grubu	Tarçın grubu	Karanfil grubu	p değeri
<b>RANKL seviyeleri</b>	29.88±6.86 <sup>a</sup>	108.25±3.03 <sup>b</sup>	60.06±7.94 <sup>c</sup>	69.13±7.49 <sup>c</sup>	0.000 test1
<b>OPG seviyeleri</b>	45.71±6.64 <sup>a</sup>	12.42±9.81 <sup>b</sup>	63.51±7.28 <sup>c</sup>	53.82±7.87 <sup>c</sup>	0.000 test1
<b>iNOS seviyeleri</b>	39.75±13.18 <sup>a</sup>	113.92±11.47 <sup>b</sup>	65.61±12.04 <sup>c</sup>	72.38±18.83 <sup>c</sup>	0.001 test1
<b>COX-2 seviyeleri</b>	36.16±13.92 <sup>a</sup>	102.05±7.15 <sup>b</sup>	54.75±6.32 <sup>c</sup>	58.63±6.77 <sup>c</sup>	0.000 test1



## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Periodontal hastalıklar en yaygın görülen kronik enflamatuvar hastalıklardan biridir ve birçok insanın yaşam kalitesini düşürerek oral fonksiyonlarını azaltmaktadır. Periodontal hastalıkların başlamasını engelleyip hastalığı önlemek, başlangıç ve ilerleme mekanizmalarını araştırmak ve mevcut tedavi yaklaşımlarının etkinliğini arttırmak amacıyla geliştirilmiş olan bazı deneysel yaklaşımlar bulunmaktadır. Bunlardan en sık kullanılanı deneysel modellerde periodontitis indüksiyonu ve *in vivo* hayvan çalışmalarıdır (Balci ve ark., 2019; Balci Yuce ve ark., 2018; de Lima ve ark., 2000; Demirer ve ark., 2011; Hatipoglu, 2011; Karatas ve ark., 2019; Toker ve ark., 2008; Toker ve ark., 2012; Toker ve ark., 2009). Bu araştırmada sıçanlarda oluşturulan deneysel periodontitis modeli kullanılmıştır. Sıçanlar erişilebilirlikleri, düşük maliyetli olmaları, bakımlarının kolay olması, deneysel periodontitis indüksiyonu için uygun anatomiye sahip olmaları ve deneysel uygulamaların yapılabilirliği açısından sıkça tercih edilmektedirler. Sıçanlarda deneysel hastalık indüksiyonu için en sık kullanılan yöntem ligatür yöntemidir. Ligatür yönteminde sıçanların alt veya üst çenede birinci veya ikinci azı dişi çevresine ipek bir ligatür yerleştirilerek yiyecek artıklarının birikimi sağlanır. Biriken yiyecek artıkları ilgili bölgede hızlı başlayan ve çabuk ilerleyen bir enflamasyon başlatır. Başlayan bu enflamasyon periodontal ligament ve alveol kemiği de etkileyerek periodontitise yol açar (de Lima ve ark., 2000; Demirer ve ark., 2011; Di Paola ve ark., 2005; Struillou ve ark., 2010; Toker ve ark., 2008; Toker ve ark., 2012; Toker ve ark., 2009; Weinberg ve Bral, 1999).

Ligatürün azı dişler çevresindeki etkisi yereldir ve ligatürün yerleştirilmesini takiben 3. günde yıkım şiddetlenerek 7.-11. günlerde en üst düzeye ulaşır ve 14. günden sonra yıkım şiddetinde bir azalmayla birlikte kemik kaybında hafif bir duraklama gözlenir (de Lima ve ark., 2000; Di Paola ve ark., 2005; Holzhausen ve ark., 2005). Deneysel periodontitiste periodontal hastalık şiddeti ve buna bağlı olarak oluşan alveol kemik seviyesi ve kayıp miktarı birkaç farklı yolla belirlenebilir. Alveol kemiğin morfolojik olarak değerlendirilmesiyle kemik kaybı mine-sement sınırı ve alveol kemiğin en üst noktası arasındaki mesafenin ölçülmesi ile veya bu bölgedeki alanın hesaplanması ile

belirlenebilir ve her iki ölçüm de alveol kemik kaybı ile ilgili güvenilir bilgi sağlamaktadır (de Lima ve ark., 2000; Kuhr ve ark., 2004; Toker ve ark., 2008; Toker ve ark., 2012). Bu araştırmada sıçanlara yerleştirilen ligatürler 14 gün boyunca dişler çevresinde kalmış ve deneysel periodontitis induksiyonu sağlanmıştır. Çalışma gruplarında alveol kemik kaybı miktarı mine-sement sınırı alveol kemik mesafesi ve alanının ölçülmesiyle belirlenmiştir. Her iki ölçümde de ligatürlenmeyen kontrol grubunda diğer tüm gruplara oranla daha az kemik yıkımı görülmüştür. Periodontitis grubunda kemik kaybı diğer gruplara oranla anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Tarçın ve karanfil yağı lipozomları, deneysel periodontitisteki kemik kaybını önlemede başarılı olmuş ve bu gruplarda periodontitis grubuna oranla daha düşük kemik kaybı gözlenmiştir. Bu gruplar kendi içlerinde karşılaştırıldığında ise, herhangi bir anlamlı farka rastlanmamıştır.

Ligatür ile indüklenen deneysel periodontitis modelinin bazı limitasyonları vardır. Deneysel hayvanları, periodontitis patogenezi araştırmak için sıkça kullanılmaktadır ancak çalışmalarda kullanılan hayvanlar anatomi, fizyoloji, histoloji ve immünoloji açısından insanlardan farklıdır. Diş çevresine yerleştirilen ligatür, sıçanların ağız ortamında bulunan bakteri türleri, ligatüre karşı gelişen enflamasyon yanıtı ve enflamasyonun ilerlemesiyle birlikte oluşan bağışıklık yanıtındaki farklılıklar nedeniyle insanlarda oluşan periodontitise oranla daha akut gelişen ve hızlı ilerleyen bir yıkıma yol açar (Di Paola ve ark., 2005; Kuhr ve ark., 2004). Ancak sıçanlarda oluşturulan deneysel periodontitis, limitasyonlarına rağmen hastalık seyri ve tedavi yaklaşımlarının incelenebilmesi, klinik öncesi ilaç uygulamalarının veya daha önce çalışılmamış önleyici veya terapötik ajanların etkisini değerlendirilebilmesini sağlar ve bu açıdan oldukça faydalı bir çalışma modelidir.

Periodontitis ağız ortamında bulunan bakterilerin başlattığı ve konak savunma sisteminin şiddetlendirdiği kronik enflamatuvar bir hastalıktır (Yen ve ark., 2008). Periodontal dokularda başlayan bakteriyel enfeksiyon ilk önce dişeti dokusunda enflamasyon başlatır ve daha sonra periodontal ligamentin diş yüzeyinden ayrılması ve dişi destekleyen alveol kemiğin rezorpsiyonu ile periodontitis oluşur. Periodontitiste

oluşan kemik rezorpsiyonu osteoklastlar tarafından indüklenir (Vardar ve ark., 2003). Nükleer faktör-B ligandının reseptör aktivatörü (RANKL), reseptörü RANK ve OPG, osteoklast farklılaşmasını, devamlılığını ve fonksiyonunu düzenleyen anahtar moleküllerdir (Lacey ve ark., 1998; Suda, T. ve ark., 1999). Bu sinyal yolu periodontal dokuların homeostazının idamesi için önemlidir (Hasegawa ve ark., 2002). Periodontitis gibi patolojik koşullar altında RANKL ekspresyonunun arttığı ve/veya OPG ekspresyonunun azaldığı ve dolayısıyla RANKL/OPG oranının değiştiği bildirilmiştir (Bostancı ve ark., 2007; César-Neto ve ark., 2007; Mogi ve ark., 2004).

Bu açıdan, Prietto ve ark. sıçanlarda gerçekleştirdikleri çalışmalarında periodontitis tedavisi ile birlikte uygulanan bir antibakteriyel ajan olan klorheksidinin kemik yıkımını önlediğini, dişetinde ve periodontal ligamentte enflamatuvar hücre birikimini azalttığını, RANKL ve TRAP seviyelerini düşürerek OPG seviyelerini arttırdığını göstermişlerdir (Prietto ve ark., 2020). Sojod ve ark. RANK/RANKL yolağının periodontal yıkım gelişimindeki rolünü genetik olarak aşırı RANK ekspresyonu oluşturulmuş farelerde gözlenen şiddetli kemik yıkımı ile göstermişlerdir (Sojod ve ark., 2017). Zhang ve ark. da periodontitiste artmış yıkımın, yüksek enflamatuvar hücre aktivasyonu ve RANKL/OPG oranı ile ilişkili olduğunu ve enflamatuvar hücre aktivasyonunun önlenmesi ile periodontal yıkımın ve dokudaki RANKL/OPG seviyeleri oranının azaldığını göstermiştir (Zhang, Z. ve ark., 2020). Benzer şekilde, Zhong ve ark. da sıçan ve insan dokularında gerçekleştirdikleri çalışmalarında kemik kaybı ve hastalık şiddetinin dokuda artmış RANKL ve azalmış OPG seviyeleri ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (Zhong ve ark., 2019). Bu çalışmada alveol kemik dokusundaki RANKL ve OPG seviyeleri immünohistokimya ile tespit edilmiştir. Literatürde de belirtildiği gibi (Bostancı ve ark., 2007; César-Neto ve ark., 2007; Mogi ve ark., 2004; Prietto ve ark., 2020; Sojod ve ark., 2017; Zhang, Z. ve ark., 2020; Zhong ve ark., 2019), periodontitis grubunda RANKL seviyeleri diğer tüm gruplara oranla anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur. Aksine, en düşük OPG seviyeleri periodontitis grubunda gözlenmiştir. RANKL osteoklastik aktivitenin en önemli göstergelerindedir ve RANKL uyarımı osteoklastlarda aktivasyon ve TRAP üretimine yol açar. Dolayısıyla RANKL ile TRAP üretimi arasında bir ilişki söz konusudur (Boyce, B. F. ve Xing,

2008, 2007b; Boyle ve ark., 2003; Lacey ve ark., 1998; Ross, 2006; Suda, T. ve ark., 1999; Takayanagi ve ark., 2002; Teitelbaum, 2000). Bu çalışmada osteoklastik aktivite kemik RANKL ve OPG seviyeleri ile birlikte TRAP pozitif osteoklast sayıları ile değerlendirilmiştir. TRAP pozitif osteoklast sayıları en yüksek periodontitis grubunda tespit edilmiştir. Diğer gruplarda osteoklast sayısı periodontitis grubuna oranla anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur.

Prostaglandinler vücutta enfeksiyona karşı gelişen bağışıklık yanıtının önemli araçlarıdır ve başta PGE<sub>2</sub> olmak üzere, periodontal dokularda enflamasyonun başlama ve ilerlemesinde, periodontal hastalığın şiddetlenmesinde ve alveol kemik yıkımının oluşmasında büyük rolleri bulunmaktadır (Vardar ve ark., 2003; Yen ve ark., 2008). PGE<sub>2</sub>, araşidonik asit metabolizmasının en önemli ürünlerinden biridir ve COX-1 ve COX-2 tarafından sentezlenmektedir (Smith ve ark., 1996). COX-1 ve COX-2 yapı ve işlev açısından birbirine benzeyen iki enzim olmasına rağmen, COX-1 neredeyse tüm organ ve dokularda bulunan ve sentezi dış faktörler tarafından çok fazla indüklenmeyen bir enzim iken, COX-2 birçok dokuda fizyolojik koşullarda bulunmaz ve sentezi pro-enflamatuvar sitokinler tarafından indüklenir (Dubois ve ark., 1998). Periodontitise bağlı olarak gelişen enflamasyon durumunda da gingival dokularda COX-2 ekspresyonunda önemli bir artış bildirilmiştir (Lohinai ve ark., 2001; Miyauchi ve ark., 2004). Ek olarak periodontal enflamasyonun önlenmesi ile dokudaki COX-2 seviyelerinde önemli düşüş sağlanmıştır (Karatas ve ark., 2019). Moro ve ark. sıçanlarda gerçekleştirdikleri çalışmalarında COX-2'nin alveol kemik yıkımı ve periodontal ligamentteki enflamatuvar hücre sayısına paralel olarak artmış olduğunu ve kemik yıkımı ve enflamasyondaki düşmenin COX-2 seviyesinde de azalma sağladığını belirtmişlerdir (Moro ve ark., 2019).

COX-2 enflamatuvar olayların en önemli katılımcılarından ve seçici olarak engellenmesi doğrudan enflamasyonun ilerlemesini önler. Bezerra ve ark. seçici COX-2 blokajının sıçanlarda matriks yıkıcı enzim miktarını ve alveol kemik yıkımını önlediğini göstermiştir (Bezerra ve ark., 2000). Branco-de-Almeida ve ark. de sıçanlarda gerçekleştirilen bir diğer çalışmada benzer şekilde COX-2'nin engellenmesinin

enflamasyon ve kemik yıkımını önlediğini bildirmişlerdir (Branco-de-Almeida ve ark., 2012). COX-2 inhibitörleri haricinde, periodontal dokularda enflamasyonu azaltan diğer ajanlar da COX-2 ekspresyonlarında azalma ile birlikte kemik yıkımını azaltmada etkili bulunmuşlardır (de Araújo ve ark., 2017; Karatas ve ark., 2019). COX-2 seviyelerindeki azalmaya genellikle RANK/RANKL/OPG aktivasyonundaki azalma da eşlik ederek periodontal dokularda enflamasyon ve kemik kaybında önemli bir iyileşme elde edilmiştir (de Araújo ve ark., 2017). Bu açıdan, Araujo ve ark. anti-enflamatuvar ajanların periodontal dokulardaki enflamasyon ile birlikte COX-2, MMP-2, MMP-9, RANKL/RANK/OPG yolağı proteinlerinde de azalma sağladığını bildirmiştir (Araújo, Aurigena Antunes, De Souza, ve ark., 2013). Araujo ve ark. bir diğer araştırmalarında COX-2 ve RANKL/OPG yolağındaki azalma ile birlikte güçlü pro-enflamatuvar sitokinler olan IL-1 $\beta$  ve TNF- $\alpha$  seviyelerinde de azalma bildirmişlerdir (Araújo, Aurigena A, Souza, ve ark., 2013).

COX-2 seviyelerindeki azalma doğrudan enflamasyon şiddetindeki azalmaya işaret etmektedir. Enflamasyonla ve özellikle makrofaj gibi fagositoz yapan hücrelerin enflamasyon ve enfeksiyondaki rolleri ile ilişkili bir diğer mediatör de iNOS'tur. iNOS, makrofajların oksidatif patlama ile yüksek oranda NO sentezlemesini sağlar ve NO yüksek oranda antibakteriyel bir aktiviteye sahiptir. Karataş ve ark. sıçanlarda gerçekleştirdikleri çalışmalarında anti-enflamatuvar ve antioksidan bir aktiviteye sahip olan vanilik asidin periodontal ligament ve alveol kemikte yıkımını azalttığını, dokularda enflamatuvar hücre sayılarını düşürdüğünü ve MMP-1, COX-2 ve iNOS ekspresyonlarını azalttığını bildirmişlerdir (Karatas ve ark., 2019). Branco-de-Almeida ve ark. da periodontal dokularda enflamasyon ve yıkım şiddeti artışının dokudaki iNOS seviyesindeki artışla birlikte oluştuğunu göstermişlerdir (Branco-de-Almeida ve ark., 2012). Benzer şekilde, Ni ve ark. da sıçanlarda gerçekleştirdikleri araştırmalarında anti-enflamatuvar ajan kullanımının, deneysel periodontitise bağlı olarak gelişen alveol kemik yıkımını önlediği, iNOS, COX-2, MMP-2 ve MMP-9 seviyelerini düşürdüğünü bildirmişlerdir (Ni ve ark., 2016). Ek olarak Li ve ark. gingival fibroblastların LPS ile uyarıldığında yüksek oranda IL-6, IL-8, iNOS ve COX-2 sentezlediğini ve antioksidan ve anti-enflamatuvar özellikleri olan kafeik asit fenil esteri uygulamasının bu

mediatörlerin seviyelerini önemli ölçüde düşürdüğünü belirtmiştir (Li, Lei ve ark., 2017).

Periodontal dokularda enflamasyonda azalma hastalıkla ilişkili kemik kaybında da azalma sağlar. Bu açıdan, Freire ve ark. sıçanlarda deneysel periodontitis oluşturarak anti-enflamatuvar ve antioksidan bir ajanın etkisini değerlendirmiştir. Bulguları, alveol kemik kaybı ve oksidatif stres seviyelerinde azalma, TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , IL-8 seviyelerinde ve COX-2, iNOS, RANK ve RANKL ekspresyonlarında anlamlı düzeyde azalma ve anti-inflamatuvar sitokin IL-10 ve kemik alkalin fosfatase seviyelerinde artış göstermiştir (Freire ve ark., 2019). Periodontal hastalıklar bakteri enfeksiyonu ile başlayan hastalıklardır ve konağın verdiği bağışıklık yanıtı, enfeksiyon ile orantılıdır. Yang ve ark. sıçanlarda *P.gingivalis* enfeksiyonu ve ligatür yerleştirme ile oluşturdukları deneysel periodontitiste omega 3 yağ asitlerinin anti-enflamatuvar etkinliğini değerlendirmişlerdir. Sonuçları, omega 3 yağ asidinin pro-enflamatuvar sitokinler TNF- $\alpha$  ve IL- $\beta$ 'yi önemli düzeyde azalttığını, RANKL ve RANKL aracılı kemik yıkımını önlediğini ve iNOS ve COX-2 sentezini inhibe ettiğini göstermiştir (Yang ve ark., 2019).

Gugliandolo ve ark. da sıçanlarda oluşturulan deneysel periodontitiste önemli düzeyde artmış iNOS ve COX-2 ekspresyonu ve şiddetli kemik kaybı bildirmiş ve anti-enflamatuvar ajan kullanımının bu marker seviyelerini ve alveol kemik kaybını önemli ölçüde azalttığını bulmuşlardır (Gugliandolo ve ark., 2018). Bu araştırmanın bulguları da, periodontal dokularda enflamasyon ve buna bağlı olarak oluşan alveol kemik yıkımı ile birlikte pro-enflamatuvar göstergeler olan iNOS ve COX-2 ekspresyonlarında anlamlı düzeyde artış bulunmuştur. Periodontitis grubundaki sıçanların periodontal ligament dokusunda diğer tüm gruplara oranla yüksek bir iNOS ve COX-2 seviyesi tespit edilmiştir. Tarçın ve karanfil uçucu yağları ile tedavi edilen gruplarda iNOS ve COX-2 seviyeleri, enflamasyon ve alveol kemik kaybı seviyesi ile birlikte anlamlı bir düşüş göstermiştir. Bulgular, iNOS ve COX-2'nin enflamasyondaki rollerini doğrular niteliktedir (Bezerra ve ark., 2000; Branco-de-Almeida ve ark., 2012; Chen, Y.-F. ve ark., 2016; Chniguir ve ark., 2019; de Araújo ve ark., 2017; Guzik, T. ve ark., 2003; Kwon, H.-K. ve ark., 2011; Li, Lei ve ark., 2017; Marnett ve ark., 1999; Miyauchi ve

ark., 2004; Morita, 2002; Moro ve ark., 2019; Salvemini ve ark., 2003; Willoughby ve ark., 2000; Zhang, Z. ve ark., 2020).

Lipopolisakkaritler, gram negatif bakteri patojenitesinin başlıca sorumlusudur. Gingival ve/veya periodontal ligament hücreleri gibi yapısal hücrelerle birlikte makrofajlar gibi savunma hücreleri LPS'ye maruz kaldıklarında şiddetli bir pro-enflamatuvar sitokin üretimi, NF- $\kappa$ B aktivasyonu ve bağışıklık yanıtı gözlenir (Gugliandolo ve ark., 2018; Li, Lei ve ark., 2017; Yang ve ark., 2019; Zhang, N., Lv, ve ark., 2017). Anti-enflamatuvar ajanların birçoğu makrofaj hücre fonksiyonlarını baskılar, NF- $\kappa$ B aktivasyonunu bloke eder ve COX-2 ve iNOS üretimini azaltır (Bezerra ve ark., 2000; Gugliandolo ve ark., 2018; Li, Lei ve ark., 2017; Moro ve ark., 2019; Zhang, N., Lv, ve ark., 2017). Bu açıdan, trans-sinamaldehitin enflamatuvar olaylara aracılık eden en önemli yollardan biri olan mitojen ile aktive olan protein kinaz (MAPK) yolağını bloke ederek LPS ile indüklenen pro-enflamatuvar sitokin salınımını ve makrofajlarda iNOS üretimini önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir (Kim, M. E. ve ark., 2018).

*trans*-Sinamaldehit ayrıca çok güçlü bir NF- $\kappa$ B düzenleyicisidir. Chen ve ark. *trans*-sinamaldehitin LPS ile indüklenen NO üretimini bloke ettiğini, NF- $\kappa$ B aktivasyonunu engellediğini ve iNOS ve COX-2 üretimini durdurduğunu göstermiştir (Chen, Y.-F. ve ark., 2016). *trans*-Sinamaldehit, tarçın uçucu yağında bulunan birçok farklı biyolojik aktiviteye sahip olan önemli bir fenil propanoit türevi bileşiktir ve tarçının anti-enflamatuvar, antibakteriyel ve immunmodülatör etkilerinden sorumludur (Chen, Y.-F. ve ark., 2016; Kim, M. E. ve ark., 2018; Kwon, H.-K. ve ark., 2011; Mendi ve ark., 2017; Ranasinghe ve ark., 2013; Tsuji-Naito, 2008; Wu ve ark., 2018). Kwon ve ark. tarçın ekstresinin bağışıklık hücrelerinden antijen sunucu hücrelerin matürasyonunu ve T hücre çoğalmasını önlediği, COX-2 üretimini baskıladığı ve pro-enflamatuvar sitokinler IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 ve TNF- $\alpha$  üretimini azaltarak anti-enflamatuvar sitokin IL-10 üretimini arttırdığını belirtmişlerdir (Kwon, H.-K. ve ark., 2011). NF- $\kappa$ B aktivasyonunun önlenmesi ve iNOS üretiminin baskılanması, tarçın ve bileşimindeki moleküllerin en önemli biyolojik aktivitelerindedir (Kanuri ve ark., 2009; Kwon, J.-Y. ve ark., 2012; Li, R. ve ark., 2013). Kanuri ve ark. tarçın özütünün LPS ile indüklenen NO, iNOS ve TNF- $\alpha$  sentezini azalttığını ve NF- $\kappa$ B yolağını baskıladığını göstermiştir

(Kanuri ve ark., 2009). Tarçın ve içerdiği trans-sinamaldehit, ayrıca güçlü bir antibakteriyeldir. Chung ve ark. *trans*-sinamaldehitin *A.actinomycescomitans* (ATCC 33384) ile uyarılan makrofaj hücrelerinde ve indüklenen deneysel periodontitiste NF- $\kappa$ B aktivitesini önlediğini, IL-1 $\beta$  ve TNF- $\alpha$  salınımını azalttığını ve alveol kemik yıkımını önlediğini bulmuştur (Chung ve ark., 2018).

Bu çalışmanın bulguları da tarçın uçucu yağının lipozom olarak *A. actinomycescomitans* inokülasyonu ve ligatür yerleştirme ile oluşturulan deneysel periodontitiste kemik kaybını engellediğini göstermiştir. Deneysel periodontitis oluşturulmuş sıçanlarda alveol kemik seviyesi sağlıklı sıçanlara ve tarçın ve karanfil lipozomu ile tedavi edilmiş sıçanlara oranla anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur. Tarçın yağı lipozomu kemik yıkımını önlemiştir. Kemik yıkımındaki azalma, osteoklast sayılarındaki azalma ile uyumludur. Gruplarda en yüksek osteoklast sayıları tedavi edilmeyen periodontitis grubuna oranla anlamlı düzeyde düşük bulunurken, osteoblast sayıları periodontitis grubuna oranla anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Tarçın yağının alveol kemik kaybını önlemedeki etkisi, hem kemik kaybı mesafesi hem alanı ölçümünde belirgin olarak gözlenmiştir. Kemik kaybındaki azalma, alveol kemikte RANKL ekspresyonundaki azalma ve OPG ekspresyonundaki artma ile de paralellik göstermektedir. Periodontitis grubunda RANKL seviyeleri en yüksek ve OPG seviyeleri en düşük bulunurken tarçın yağı lipozomu bu seviyeleri düzenleyerek kemik yapımını arttırmış ve yıkımını azaltmıştır.

Tarçın yağı, periodontal ligamentteki enflamatuvar hücre sayılarında da anlamlı azalma sağlamıştır. Enflamatuvar hücre sayıları, osteoblast ve osteoklast sayıları ile birlikte alveol kemik kaybı değerleri, tarçın yağı lipozomunun deneysel periodontitiste enflamasyon ve kemik yıkımını anlamlı ölçüde azalttığını göstermektedir. Tarçının anti-enflamatuvar etkisi, immünohistokimya incelemesinde iNOS ve COX-2 seviyelerindeki azalma ile de gözlenmektedir. Periodontitis grubunda iNOS ve COX-2 seviyeleri diğer gruplara oranla önemli düzeyde yüksek bulunurken, tarçın grubunda bu seviyeler anlamlı ölçüde düşüş göstermiştir. Sonuçların gösterdiği anti-enflamatuvar etki, literatürde tarçın yağı, tarçın ekstresi veya trans-sinamaldehitin gösterdiği anti-



enflamatuvar etki ile uyumluluk göstermektedir (Chung ve ark., 2018; Kanuri ve ark., 2009; Kim, M. E. ve ark., 2018; Kwon, J.-Y. ve ark., 2012; Li, R. ve ark., 2013).

Uçucu yağlar çok farklı farmakolojik etkiye sahiptir ve bu yağlar içinde en çok biyolojik aktivite gösterenlerden biri de karanfil yağıdır (Bakour ve ark., 2018; Miyazawa ve Hisama, 2003; Nabavi ve ark., 2015; Ogata ve ark., 2000; Ranasinghe ve ark., 2013; Vasconcelos ve ark., 2018; Yogalakshmi ve ark., 2010; Zhu ve ark., 2017). Tarçın ve karanfil uçucu yağları antibakteriyel ve anti-enflamatuvar özellikleri ve ortak içerikleri öjenol açısından benzerlik göstermektedir (Baker, I. ve ark., 2013; Huss ve ark., 2002; Lang ve ark., 2019; Wińska ve ark., 2019). Lang ve ark. makrofaj hücrelerinin LPS uyarımı sonrasında yüksek miktarda fagositoz aktivitesi ve iNOS ve IL-6 salgıladığını ve karanfil ve tarçın yağının iNOS ve IL-6 üretimini önemli ölçüde azalttığını bildirmiştir (Lang ve ark., 2019). Huss ve ark. karanfil yağının en önemli bileşenlerinden biri olan öjenolün COX-2 aktivitesini büyük ölçüde bloke ettiğini bildirmiştir (Huss ve ark., 2002). Karanfil yağının en bilinen etkisi antibakteriyel etkidir (Wińska ve ark., 2019).

Karanfil aynı zamanda LPS ile indüklenen makrofaj hücrelerinin pro-enflamatuvar aktivitelerini de önlemektedir. Lee ve ark. karanfilden izole edilen moleküllerin makrofajlardan iNOS ve COX-2 üretimini anlamlı düzeyde engellediğini ve pro-enflamatuvar sitokinler IL-6 ve TNF- $\alpha$  salınımlarını azalttığını bulmuştur. Sıçanlarda gerçekleştirdikleri araştırmalarında da karanfil bileşenlerinin bu anti-enflamatuvar etkilerinin MAPK yolağını bloke edilmesine bağlı olarak oluştuğunu göstermişlerdir (Lee ve ark., 2016). Kim ve ark. da fare makrofaj hücrelerinde gerçekleştirdikleri *in vitro* araştırmalarında karanfil yağı bileşeni öjenolün güçlü bir COX-2 inhibisyonu sergilediğini tespit etmişlerdir (Kim, S. S. ve ark., 2003). Öjenolün LPS ile indüklenen COX-2 ve iNOS inhibisyonu aynı zamanda Li ve ark. tarafından da gösterilmiştir (Li, W. ve ark., 2006). Kaur ve ark. öjenolün COX-2 ve iNOS üretimini önlemedeki etkisinin NF- $\kappa$ B yolağını baskılaması sayesinde oluştuğunu bulmuştur. iNOS ve COX-2'ye ek olarak öjenol uygulamasının güçlü pro-enflamatuvar sitokinler olan TNF- $\alpha$ , IL-6 ve PGE<sub>2</sub> seviyelerinde de azalma sağladığını bildirmişlerdir (Kaur ve ark., 2010). Öjenol ile baskılanmış NF- $\kappa$ B aktivasyonu bir diğer çalışmada da belirtilmiştir. Bu

araştırmada farelerde LPS ile oluşturulan enflamasyon ve TNF- $\alpha$  artışının NF- $\kappa$ B yolağının bloke edilmesi ile önlediği bildirilmiştir (Magalhães ve ark., 2010).

Bir diğer çalışmada karanfilin osteoklastik farklılaşma ve aktivasyonu önlediği, TRAP, katepsin K ve MMP-9 üretimini baskıladığı ve RANKL aktivitesini azalttığını belirtilmiştir (Zhang, X.-W. ve ark., 2014). Benzer şekilde, Deepak ve ark. da öjenolün RANKL'm indüklediği osteoklast aktivasyonunu önlediğini bildirmiştir. Bulguları öjenolün makrofaj hücrelerinin osteoklasta farklılaşmasını engellediğini ve TRAP, katepsin K ve matriks yıkıcı enzimlerin sentezini azalttığını ve bu etkilerin NF- $\kappa$ B blokajı ile sağlandığını göstermiştir (Deepak ve ark., 2015). Öjenolün osteoporotik sıçanlarda alveol kemik üzerindeki etkisinin değerlendirildiği bir diğer araştırmada, öjenolün alveol kemik yıkımını büyük ölçüde engellediği bulunmuştur. Ek olarak, osteoporozlu sıçanlarda RANKL, IL-1 $\beta$ , IL-6 ve TNF- $\alpha$  seviyelerinde anlamlı bir artış gözlendiği ve öjenol uygulamasının bu seviyeleri önemli ölçüde azalttığı da ifade edilmiştir (Abuhashish ve ark., 2018). Bir diğer çalışmada da karanfil yağının osteoporozun azalttığı kemik mineral içeriği, densitesi ve dayanıklılığını arttırdığı bildirilmiştir (Karmakar ve ark., 2012).

Karanfil yağı ve öjenolün oral ve periodontal dokulardaki en bilinen etkisi antibakteriyel etkisidir (Zhang, Y., Wang, ve ark., 2017). Zhang ve ark. karanfil uçucu yağının *P. gingivalis* (ATCC33277) biyofilm oluşumunu engellediği ve virülans faktörlerini baskıladığını göstermiştir. Karanfil yağının antibakteriyel etkisinin hücre zarı geçirgenliğinin artması ve membran bütünlüğünün bozulmasından kaynaklandığı ifade edilmiştir (Moon ve ark., 2011; Zhang, Y., Wang, ve ark., 2017). Tüm bu etkileri göz önüne alındığında karanfil uçucu yağı, gerek antibakteriyel etkisi gerekse anti-enflamatuvar aktivitesi sayesinde periodontal hastalığın önlenmesinde önemli bir başarı sağlayabilir. Bu çalışmanın bulguları, deneysel periodontitis modelinde lipozom olarak verilen karanfil yağının alveol kemik kaybını önlediğini işaret etmektedir. Alveol kemik yıkımındaki azalma, karanfil grubunda periodontitis grubuna oranla gözlenen osteoklastik aktivite azalması ve osteoblast sayısı artışı ile de desteklenmektedir. Kemik yıkımının en önemli düzenleyicisi RANKL seviyeleri de periodontitis grubu ile karşılaştırıldığında karanfil grubunda anlamlı düşme göstermiştir. RANKL

seviyelerindeki azalmaya OPG seviyelerindeki artış eşlik etmektedir. Kemik kaybının azalması, enflamasyondaki gerilemeden kaynaklanmaktadır. Karanfil grubunda gözlenen periodontitise oranla daha düşük bulunan enflamatuvar hücre sayıları, daha düşük iNOS ve COX-2 ekspresyonları da karanfilin anti-enflamatuvar aktivitesine işaret etmektedir.

Bu araştırmada, tarçın ve karanfil uçucu yağlarının lipozomlarının sıçanlardaki etkinliği değerlendirilmiştir. Lipozom, uçucu yağlar gibi uçucu ve kararsız ajanların etkin bir şekilde uygulanabilmesine izin veren enkapsülasyon yöntemlerinden biridir. Lipozom bir ajanın lipit ile kapsülasyonu ile elde edilen küresel veziküler yapıdır (El Asbahani ve ark., 2015; Sebaaly ve ark., 2015; Sherry ve ark., 2013). Lipozomlar, kapsüllenen ajanların biyouyumluluğunu ve biyoyararlanımını arttırarak, etki etme süresini uzatmak gibi bazı avantajlara sahiptir (Kim, H.-H. Y. ve Baianu, 1991; Neethirajan ve Jayas, 2011). Tarçın uçucu yağı, trans-sinnamaldehit gibi tarçın bileşenleri, karanfil esansiyel yağı ve öjenol gibi karanfil yağı bileşenlerinin lipozom formlarının etkinliği literatürde önceki çalışmalarda belirtilmiştir (Chen, W. ve ark., 2019; Cui ve ark., 2016; Ibrahim, I. M. ve ark., 2018; Nagababu ve Lakshmaiah, 1997; Sebaaly ve ark., 2015).

Cui ve ark. tarçın yağı lipozomunun en dirençli bakterilerden biri olan metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'a (ATCC 43300) karşı bile etki gösterdiğini bildirmiştir (Cui ve ark., 2016). Lipozom enkapsülasyonunun tarçın yağının uçuculuğunu azaltarak etkisini arttırdığı ifade edilmiştir. Faikoh ve ark. sinnamaldehit lipozomunun *in vivo* olarak dirençli ptojenlere karşı kuvvetli antimikrobiyal etkinlik sergilediğini ve IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  seviyelerini azaltarak ve NF- $\kappa$ B aktivasyonunu önleyerek enfeksiyona karşı konak savunmasını uyardığını göstermiştir (Faikoh ve ark., 2014). Sinnamaldehit lipozomunun antibakteriyel etkisinin araştırıldığı bir başka araştırmada, lipozom kapsülünün trans-sinnamaldehitin stabilitesini arttırarak uzun süreli antibakteriyel etki göstermesini sağladığı belirtilmiştir (Chen, W. ve ark., 2019). trans-Sinnamaldehitin fırsatçı bir oral patojen olan *Candida albicans*'a karşı etkisinin incelendiği bir diğer araştırmada da antimikrobiyal etkinliğin lipozom oluşumu ile arttığı ifade edilmiştir (Khan ve ark., 2017).

Tarçın uçucu yağı gibi karanfil uçucu yağının da etkinliğinin lipozom oluşumu ile arttırıldığı gösterilmiştir. Ho ve ark. karanfil uçucu yağı lipozomunun peroksinitrite bağlı olarak oluşan oksidatif doku hasarını önlediğini göstermiştir (Ho ve ark., 2008). Sebaaly ve ark. da karanfil uçucu yağı ve öjenolün lipozom enkapsülasyonunu araştırmış ve her iki ajanın da lipozom formunun serbest formlarına oranla fiziksel ve biyolojik özelliklerinin geliştiğini belirtmişlerdir (Sebaaly ve ark., 2016). Ahmad ve ark. da karanfil uçucu yağı lipozomunun *Candida albicans*'a karşı güçlü antifungal aktivite gösterdiğini bildirmiştir (Ahmad ve ark., 2005). Öjenolün antioksidan aktivitesinin değerlendirildiği bir araştırmada Nagababu ve ark. öjenol lipozomunun ksantin oksidaza karşı antioksidan aktivitesini araştırmıştır. Bulguları, öjenol lipozomunun serbest radikalleri nötralize etmede ve ksantin oksidaz aktivitesini engellemede başarılı bulunduğunu göstermiştir (Nagababu ve Lakshmaiah, 1997). Bu araştırmada uygulanan tarçın ve karanfil uçucu yağı lipozomlarının, sıçanlarda deneysel periodontitise bağlı oluşan enflamasyonu ve kemik kaybını ve ilişkili markerları azalttığı bulunmuştur. Ancak bu çalışmanın bulguları belirli limitasyonlar dikkate alınarak yorumlanmalıdır. İlk olarak bu çalışma bir hayvan modelidir. Sıçanlar anatomik, fizyolojik ve immünolojik olarak insanlardan farklılık gösterir. İkincil olarak, bu çalışmada kemik kaybı morfolojik olarak belirlenmiştir. Mikro bilgisayarlı tomografi gibi 3 boyutlu analizler kemik kaybının daha iyi incelenmesini olanak sağlayacaktır. Üçüncül olarak bu araştırma sıçanlarda gerçekleştirilen ve analiz yöntemi olarak immünohistokimya yönteminin kullanıldığı bir araştırmadır. Western blot, RT-PCR gibi farklı yöntemlerin kullanılması tarçın ve karanfil yağının alveol kemik üzerindeki etkilerinin daha anlaşılmasını sağlayacaktır. Dördüncü ve sonuncu olarak, bu çalışmada tarçın ve karanfil yağlarının lipozomlarının etkinliği araştırılmıştır. Uçucu yağların serbest formlarının periodontitis üzerindeki etkisi değerlendirilmemiştir.

## Sonuç

- *A.actinomycetemcomitans* ve ligatürleme ile oluşturulan deneysel periodontitis alveol kemikte şiddetli bir yıkıma yol açmıştır.

- *A.actinomycetemcomitans* ve ligatürleme ile oluşturulan deneysel periodontitis periodontal dokuda enflamatuvar hücre ve osteoklast sayısı artışına ve osteoblast sayısında azalmaya yol açmıştır.
- *A.actinomycetemcomitans* ve ligatürleme ile oluşturulan deneysel periodontitis alveol kemikte ve periodontal ligamentte COX-2, iNOS ve RANKL ekspresyonunda artışa ve OPG ekspresyonunda azalmaya neden olmuştur.
- Tarçın ve karanfil uçucu yağları başarılı bir şekilde soya lesitini fosfolipitlerine hapsedilerek lipozom oluşumu elde edilmiştir.
- Tarçın ve karanfil uçucu yağ lipozomları deneysel periodontitis oluşturulan sıçanlara 14 gün boyunca uygulanmıştır. Tarçın yağı lipozomu günlük 75 mg/kg tarçın yağı içeren 0.5 ml lipozom-distile su karışımı olarak ve karanfil yağı lipozomu günlük 25 mg/kg karanfil yağı içeren 0.5 ml lipozom-distile su karışımı olarak uygulanmıştır.
- Tarçın ve karanfil uçucu yağ lipozomları periodontal ligamentteki enflamatuvar hücre sayılarını azaltmış ve pro-enflamatuvar göstergeler olan COX-2 ve iNOS seviyelerini düşürmüştür.
- Tarçın ve karanfil yağları lipozomları alveol kemik yıkımını azaltmış, osteoklast sayılarını düşürmüş ve osteoblast sayılarını arttırmıştır.
- Tarçın ve karanfil uçucu yağları kemik dokusunda RANKL ekspresyonlarını azaltmış ve OPG ekspresyonlarını arttırmıştır.

## 6. KAYNAKLAR

- Abuhashish, H. M., Khairy, D. A., Abdelsalam, M. M., Alsayyah, A., Ahmed, M. M. Al-Rejaie, S. S., 2018. In-vivo assessment of the osteo-protective effects of eugenol in alveolar bone tissues. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 97, 1303-1310.
- Ahmad, N., Alam, M., Shehbaz, A., Khan, A., Mannan, A., Hakim, S. R., Bisht, D. Owais, M., 2005. Antimicrobial activity of clove oil and its potential in the treatment of vaginal candidiasis. *Journal of drug targeting*, 13 (10), 555-561.
- Ajiboye, T., Ajala-Lawal, R. Adeyiga, A., 2019. Caffeic acid abrogates 1, 3-dichloro-2-propanol-induced hepatotoxicity by upregulating nuclear erythroid-related factor 2 and downregulating nuclear factor-kappa B. *Human & experimental toxicology*, 0960327119851257.
- Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., Samiei, M., Kouhi, M. Nejadi-Koshki, K., 2013. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale research letters*, 8 (1), 102.
- Altuntaş, A., Yılmaz, H. R., Altuntaş, A., Uz, E., Demir, M., Gökçimen, A., Aksu, O., Bayram, D. Ş. Sezer, M. T., 2014. Caffeic acid phenethyl ester protects against amphotericin B induced nephrotoxicity in rat model. *BioMed research international*, 2014.
- An, Y. H. Martin, K. L. (2003). *Handbook of histology methods for bone and cartilage*: Springer.
- Anonim: [http://www.karedent.com/tedavi-hizmetleri/dis-eti-hastalıkları\\_periodontoloji/](http://www.karedent.com/tedavi-hizmetleri/dis-eti-hastalıkları_periodontoloji/), 15/12/2019
- Anonim: <https://hdek.gop.edu.tr/icerik.aspx?birimid=30&dil=tr&menuid=805>, 15/12/2019
- Araújo, A. A., De Souza, G. L., Souza, T. O., de Castro Brito, G. A., Aragão, K. S., De Medeiros, C. A. X., Lourenço, Y., Alves, M. d. S. C. F. de Araújo, R. F., 2013. Olmesartan decreases IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  levels; downregulates MMP-2, MMP-9, COX-2, and RANKL; and upregulates OPG in experimental periodontitis. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 386 (10), 875-884.
- Araújo, A. A., Souza, T. O., Moura, L. M., Brito, G. A., Aragão, K. S., Araújo, L. S., Medeiros, C. A., Alves, M. S. Araújo Jr, R. F., 2013. Effect of telmisartan on levels of IL-1, TNF- $\alpha$ , down-regulated COX-2, MMP-2, MMP-9 and RANKL/RANK in an experimental periodontitis model. *Journal of clinical periodontology*, 40 (12), 1104-1111.
- Armitage, G. C., 1999. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*, 4 (1), 1-6. doi: 10.1902/annals.1999.4.1.1
- Armitage, G. C., 2010. Comparison of the microbiological features of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontol 2000*, 53 (1), 70-88.
- Armitage, G. C., Cullinan, M. P. Seymour, G. J., 2010. Comparative biology of chronic and aggressive periodontitis: introduction. *Periodontol 2000*, 53, 7-11. doi: 10.1111/j.1600-0757.2010.00359.x

- 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 (1), 403-409.
- Baker, I., Chohan, M.Opara, E. I., 2013. Impact of cooking and digestion, in vitro, on the antioxidant capacity and anti-inflammatory activity of cinnamon, clove and nutmeg. *Plant foods for human nutrition*, 68 (4), 364-369.
- Baker, P. J., 2000. The role of immune responses in bone loss during periodontal disease. *Microbes Infect*, 2 (10), 1181-1192.
- Bakour, M., Soulo, N., Hammas, N., FATEMI, H., Aboulghazi, A., Taroq, A., Abdellaoui, A., Al-Waili, N.Lyoussi, B., 2018. The antioxidant content and protective effect of argan oil and *Syzygium aromaticum* essential oil in hydrogen peroxide-induced biochemical and histological changes. *International journal of molecular sciences*, 19 (2), 610.
- Balcerzak, M., Hamade, E., Zhang, L., Pikula, S., Azzar, G., Radisson, J., Bandorowicz-Pikula, J.Buchet, R., 2003. The roles of annexins and alkaline phosphatase in mineralization process. *Acta Biochimica Polonica*, 50 (4), 1019-1038.
- Balci, H. Y., Toker, H., Yıldırım, A., Tekin, M. B., Gevrek, F.Altunbas, N., 2019. The effect of luteolin in prevention of periodontal disease in Wistar rats. *J Periodontol*.
- Balci Yuçe, H., Lektetur Alpan, A., Gevrek, F.Toker, H., 2018. Investigation of the effect of astaxanthin on alveolar bone loss in experimental periodontitis. *Journal of periodontal research*, 53 (1), 131-138.
- Basle, M., Mazaud, P., Malkani, K., Chretien, M., Moreau, M.Rebel, A., 1988. Isolation of osteoclasts from pagetic bone tissue morphometry and cytochemistry on isolated cells. *Bone*, 9 (1), 1-6.
- Bezerra, M. M., de Lima, V., Alencar, V. B., Vieira, I. B., Brito, G. A. C., Ribeiro, R. A.Rocha, F. A. C., 2000. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol*, 71 (6), 1009-1014.
- Bostancı, N., Ilgenli, T., Emingil, G., Afacan, B., Han, B., Töz, H., Berdeli, A., Atilla, G., McKay, I.Hughes, F., 2007. Differential expression of receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand and osteoprotegerin mRNA in periodontal diseases. *Journal of periodontal research*, 42 (4), 287-293.
- Boyce, B., 2013. Advances in the regulation of osteoclasts and osteoclast functions. *Journal of dental research*, 92 (10), 860-867.
- Boyce, B. F.Xing, L., 2007a. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis research & therapy*, 9 (1), S1.
- Boyce, B. F.Xing, L., 2007b. The Rankl/Rank/Opg pathway. *Current osteoporosis reports*, 5 (3), 98-104.
- Boyce, B. F.Xing, L., 2008. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Archives of biochemistry and biophysics*, 473 (2), 139-146.
- Boyle, W. J., Simonet, W. S.Lacey, D. L., 2003. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 423 (6937), 337.
- Bradshaw, A. D., 2012. Diverse biological functions of the SPARC family of proteins. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 44 (3), 480-488.

- Branco-de-Almeida, L. S., Franco, G. C., Castro, M. L., dos Santos, J. G., Anbinder, A. L., Cortelli, S. C., Kajiya, M., Kawai, T., Rosalen, P. L., 2012. Fluoxetine inhibits inflammatory response and bone loss in a rat model of ligature-induced periodontitis. *J Periodontol*, 83 (5), 664-671.
- Buckley, C., Khaleque, N., Bellamy, S., Robins, M., Zhang, X. (1998). Mapping the organic and inorganic components of bone X-ray Microscopy and Spectromicroscopy (pp. 151-159): Springer.
- Buckwalter, J., Cooper, R., 1987. Bone structure and function. Instructional course lectures, 36, 27-48.
- Budai, M., Szogyi, M., 2001. Liposomes as drug carrier systems. Preparation, classification and therapeutic advantages of liposomes. *Acta Pharmaceutica Hungarica*, 71 (1), 114-118.
- Caton, J. G., Armitage, G., Berglundh, T., Chapple, I. L., Jepsen, S., Kornman, K. S., Mealey, B. L., Papananou, P. N., Sanz, M., Tonetti, M. S., 2018. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions—Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Periodontol*, 89, S1-S8.
- César-Neto, J., Duarte, P., De Oliveira, M., Tambeli, C., Sallum, E., Nociti Jr, F., 2007. Smoking modulates interleukin-6: interleukin-10 and RANKL: osteoprotegerin ratios in the periodontal tissues. *Journal of periodontal research*, 42 (2), 184-191.
- Chaieb, K., Hajlaoui, H., Zmantar, T., Kahla-Nakbi, A. B., Rouabhia, M., Mahdouani, K., Bakhrouf, A., 2007. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. *Phytotherapy research*, 21 (6), 501-506.
- Champagne, C. M., Buchanan, W., Reddy, M. S., Preisser, J. S., Beck, J. D., Offenbacher, S., 2003. Potential for gingival crevice fluid measures as predictors of risk for periodontal diseases. *Periodontol 2000*, 31, 167-180.
- Chen, W., Cheng, F., Swing, C. J., Xia, S., Zhang, X., 2019. Modulation effect of core-wall ratio on the stability and antibacterial activity of cinnamaldehyde liposomes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 104790.
- Chen, Y.-F., Wang, Y.-W., Huang, W.-S., Lee, M.-M., Wood, W. G., Leung, Y.-M., Tsai, H.-Y., 2016. Trans-cinnamaldehyde, an essential oil in cinnamon powder, ameliorates cerebral ischemia-induced brain injury via inhibition of neuroinflammation through attenuation of iNOS, COX-2 expression and NFκ-B signaling pathway. *Neuromolecular medicine*, 18 (3), 322-333.
- Chniguir, A., Zioud, F., Marzaioli, V., El-Benna, J., Bachoual, R., 2019. *Syzygium aromaticum* aqueous extract inhibits human neutrophils myeloperoxidase and protects mice from LPS-induced lung inflammation. *Pharmaceutical biology*, 57 (1), 56-64.
- Chung, J., Kim, S., Lee, H. A., Park, M. H., Kim, S., Song, Y. R., Na, H. S., 2018. Trans-cinnamic aldehyde inhibits *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced inflammation in THP-1-derived macrophages via autophagy activation. *J Periodontol*, 89 (10), 1262-1271.
- Coleman, J. W., 2001. Nitric oxide in immunity and inflammation. *International immunopharmacology*, 1 (8), 1397-1406.



- Cui, H., Li, W., Li, C., Vittayapadung, S., Lin, L., 2016. Liposome containing cinnamon oil with antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm. *Biofouling*, 32 (2), 215-225.
- Cullinan, M. P., Ford, P. J., Seymour, G. J., 2009. Periodontal disease and systemic health: current status. *Aust Dent J*, 54 Suppl 1, S62-69. doi: 10.1111/j.1834-7819.2009.01144.x
- de Araújo, A. A., Pereira, A. d. S. B. F., de Medeiros, C. A. C. X., de Castro Brito, G. A., de Carvalho Leitão, R. F., de Souza Araújo, L., Guedes, P. M. M., Hiyari, S., Pirih, F. Q., de Araújo Júnior, R. F., 2017. Effects of metformin on inflammation, oxidative stress, and bone loss in a rat model of periodontitis. *PloS one*, 12 (8), e0183506.
- 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. *European journal of oral sciences*, 108 (2), 123-129.
- Deepak, V., Kasonga, A., Kruger, M. C., Coetzee, M., 2015. Inhibitory effects of eugenol on RANKL-induced osteoclast formation via attenuation of NF- $\kappa$  B and MAPK pathways. *Connective tissue research*, 56 (3), 195-203.
- Demirer, S., Kara, M. I., Erciyas, K., Ozdemir, H., Ozer, H., Ay, S., 2011. Effects of boric acid on experimental periodontitis and alveolar bone loss in rats. *Arch Oral Biol*. doi: 10.1016/j.archoralbio.2011.07.012
- 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 (10), 1062-1068. doi: 10.1111/j.1600-051X.2005.00818.x
- Dinarello, C. A., 2000. Proinflammatory cytokines. *Chest*, 118 (2), 503-508.
- Dua, J., Rana, A., Bhandari, A., 2012. Liposome: methods of preparation and applications. *Int J Pharm Stud Res*, 3 (2), 14-20.
- Dubois, R. N., Abramson, S. B., Crofford, L., Gupta, R. A., Simon, L. S., Van De Putte, L. B., Lipsky, P. E., 1998. Cyclooxygenase in biology and disease. *The FASEB journal*, 12 (12), 1063-1073.
- El Asbahani, A., Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E. A., Casabianca, H., El Mousadik, A., Hartmann, D., Jilale, A., Renaud, F., 2015. Essential oils: from extraction to encapsulation. *International journal of pharmaceutics*, 483 (1-2), 220-243.
- Faikoh, E. N., Hong, Y.-H., Hu, S.-Y., 2014. Liposome-encapsulated cinnamaldehyde enhances zebrafish (*Danio rerio*) immunity and survival when challenged with *Vibrio vulnificus* and *Streptococcus agalactiae*. *Fish & shellfish immunology*, 38 (1), 15-24.
- Figueredo, C., Lira-Junior, R., Love, R., 2019. T and B Cells in Periodontal Disease: New Functions in A Complex Scenario. *International journal of molecular sciences*, 20 (16), 3949.
- Flemmig, T. F., 1999. Periodontitis. *Ann Periodontol*, 4 (1), 32-38. doi: 10.1902/annals.1999.4.1.32

- Fonseca, H., Moreira-Gonçalves, D., Coriolano, H.-J. A. Duarte, J. A., 2014. Bone quality: the determinants of bone strength and fragility. *Sports Medicine*, 44 (1), 37-53.
- Freire, J. M., Chaves, H. V., Teixeira, A. H., de Sousa, L. H. T., Pinto, I. R., Costa, J. J. d. N., de Sousa, N. A., Pereira, K. M. A., Girão, V. C. Ferreira, V. C., 2019. Protective effect of *Platymiscium floribundum* Vog. in tree extract on periodontitis inflammation in rats. *PloS one*, 14 (11).
- Gemmell, E., Marshall, R. I. Seymour, G. J., 1997. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontol* 2000, 14, 112-143.
- Genco, R. J., 1992. Host responses in periodontal diseases: current concepts. *J Periodontol*, 63 (4 Suppl), 338-355.
- General, O. o. t. S., 2004. Bone health and osteoporosis: a report of the Surgeon General.
- Ghosh, N., Chaki, R., Mandal, V. Mandal, S. C., 2010. COX-2 as a target for cancer chemotherapy. *Pharmacological reports*, 62 (2), 233-244.
- Gorustovich, A. A., Steimetz, T., Nielsen, F. H. Guglielmotti, M. B., 2008. A histomorphometric study of alveolar bone modelling and remodelling in mice fed a boron-deficient diet. *Arch Oral Biol*, 53 (7), 677-682. doi: 10.1016/j.archoralbio.2008.01.011
- Graves, D. T. Cochran, D., 2003. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol*, 74 (3), 391-401. doi: 10.1902/jop.2003.74.3.391
- Gugliandolo, E., Fusco, R., D'Amico, R., Mili, A., Oteri, G., Wallace, J. L., Di Paola, R. Cuzzocrea, S., 2018. Anti-inflammatory effect of ATB-352, a H<sub>2</sub>S-releasing ketoprofen derivative, on lipopolysaccharide-induced periodontitis in rats. *Pharmacological research*, 132, 220-231.
- Guzik, T., Korb, R. Adamek-Guzik, T., 2003. Nitric oxide and superoxide in inflammation. *Journal of physiology and pharmacology*, 54, 469-487.
- Guzik, T. J., West, N. E., Pillai, R., Taggart, D. P. Channon, K. M., 2002. Nitric oxide modulates superoxide release and peroxynitrite formation in human blood vessels. *Hypertension*, 39 (6), 1088-1094.
- Hajishengallis, G. Lambris, J. D., 2016. More than complementing Tolls: complement-Toll-like receptor synergy and crosstalk in innate immunity and inflammation. *Immunological reviews*, 274 (1), 233-244.
- Hasegawa, T., Yoshimura, Y., Kikuri, T., Yawaka, Y., Takeyama, S., Matsumoto, A., Oguchi, H. Shirakawa, T., 2002. Expression of receptor activator of NF-kappa B ligand and osteoprotegerin in culture of human periodontal ligament cells. *Journal of periodontal research*, 37 (6), 405-411.
- Hatipoglu, M. (2011). streptozotosin ile diyabet oluşturulmuş deneysel periodontitisli sıçanlarda insülin ve alfa-tokoferol ytedavisinin serum sitokin düzeyleri ve dişeti iNOS ve CD95 ekspresyonu üzerine etkileri Konya Selçuk University Konya.
- Hill, P., 1998. Bone remodelling. *British journal of orthodontics*, 25 (2), 101-107.
- Ho, S.-C., Tsai, T.-H., Tsai, P.-J. Lin, C.-C., 2008. Protective capacities of certain spices against peroxynitrite-mediated biomolecular damage. *Food and Chemical Toxicology*, 46 (3), 920-928.

- Holzhausen, M., Spolidorio, D. M., Muscara, M. N., Hebling, J. Spolidorio, L. C., 2005. Protective effects of etoricoxib, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2, in experimental periodontitis in rats. *J Periodontal Res*, 40 (3), 208-211. doi: 10.1111/j.1600-0765.2005.00787.x
- Huss, U., Ringbom, T., Perera, P., Bohlin, L. Vasänge, M., 2002. Screening of ubiquitous plant constituents for COX-2 inhibition with a scintillation proximity based assay. *Journal of Natural Products*, 65 (11), 1517-1521.
- Ibrahim, F. M., Attia, H. N., Maklad, Y. A. A., Ahmed, K. A. Ramadan, M. F., 2017. Biochemical characterization, anti-inflammatory properties and ulcerogenic traits of some cold-pressed oils in experimental animals. *Pharmaceutical biology*, 55 (1), 740-748.
- Ibrahim, I. M., Abdel Kareem, I. M. Alghobashy, M. A., 2018. Evaluation of topical liposome incorporated clove oil in the treatment of idiopathic palmar hyperhidrosis: Single-blinded placebo-controlled study. *Journal of cosmetic dermatology*, 17 (6), 1084-1089.
- Icer, M. A. Gezmen-Karadag, M., 2018. The multiple functions and mechanisms of osteopontin. *Clinical biochemistry*, 59, 17-24.
- Innes, J. K. Calder, P. C., 2018. Omega-6 fatty acids and inflammation. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 132, 41-48.
- Jun-xia, X., Hai-yan, Y. Jian, Y., 2011. Microencapsulation of sweet orange oil by complex coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic. *Food Chemistry*, 125 (4), 1267-1272.
- Junka, A., Żywicka, A., Chodaczek, G., Dziadas, M., Czajkowska, J., Duda-Madej, A., Bartoszewicz, M., Mikołajewicz, K., Krasowski, G. Szymczyk, P., 2019. Potential of Biocellulose Carrier Impregnated with Essential Oils to Fight Against Biofilms Formed on Hydroxyapatite. *Scientific reports*, 9 (1), 1256.
- Kanuri, G., Weber, S., Volynets, V., Spruss, A., Bischoff, S. C. Bergheim, I., 2009. Cinnamon extract protects against acute alcohol-induced liver steatosis in mice. *The Journal of nutrition*, 139 (3), 482-487.
- Karatas, O., Yuce, H. B., Taskan, M. M., Gevrek, F., Yarkac, F. U., Keskin, A., Karatas, S. F. O. Toker, H., 2019. The effect of vanillic acid on ligature-induced periodontal disease in Wistar rats. *Arch Oral Biol*, 103, 1-7.
- Karmakar, S., Choudhury, M., Das, A. S., Maiti, A., Majumdar, S. Mitra, C., 2012. Clove (*Syzygium aromaticum* Linn) extract rich in eugenol and eugenol derivatives shows bone-preserving efficacy. *Natural product research*, 26 (6), 500-509.
- Karsenty, G. Olson, E. N., 2016. Bone and muscle endocrine functions: unexpected paradigms of inter-organ communication. *Cell*, 164 (6), 1248-1256.
- Kaur, G., Athar, M. Alam, M. S., 2010. Eugenol precludes cutaneous chemical carcinogenesis in mouse by preventing oxidative stress and inflammation and by inducing apoptosis. *Molecular Carcinogenesis: Published in cooperation with the University of Texas MD Anderson Cancer Center*, 49 (3), 290-301.
- Khan, S. N., Khan, S., Iqbal, J., Khan, R. Khan, A. U., 2017. Enhanced killing and antibiofilm activity of encapsulated cinnamaldehyde against *Candida albicans*. *Frontiers in microbiology*, 8, 1641.

- Kim, H.-H. Y.Baianu, I. C., 1991. Novel liposome microencapsulation techniques for food applications. *Trends in Food Science & Technology*, 2, 55-61.
- Kim, M. E., Na, J. Y.Lee, J. S., 2018. Anti-inflammatory effects of trans-cinnamaldehyde on lipopolysaccharide-stimulated macrophage activation via MAPKs pathway regulation. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 40 (3), 219-224.
- Kim, S. S., Oh, O.-J., Min, H.-Y., Park, E.-J., Kim, Y., Park, H. J., Han, Y. N.Lee, S. K., 2003. Eugenol suppresses cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophage RAW264. 7 cells. *Life sciences*, 73 (3), 337-348.
- Kindle, L., Rothe, L., Kriss, M., Osdoby, P.Collin-Osdoby, P., 2006. Human Microvascular Endothelial Cell Activation by IL-1 and TNF- $\alpha$  Stimulates the Adhesion and Transendothelial Migration of Circulating Human CD14+ Monocytes That Develop With RANKL Into Functional Osteoclasts. *Journal of Bone and Mineral Research*, 21 (2), 193-206.
- Klausen, B., 1991. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. *J Periodontol*, 62 (1), 59-73.
- Kobayashi, K., Takahashi, N., Jimi, E., Udagawa, N., Takami, M., Kotake, S., Nakagawa, N., Kinoshita, M., Yamaguchi, K., Shima, N., Yasuda, H., Morinaga, T., Higashio, K., Martin, T. J.Suda, T., 2000. Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J Exp Med*, 191 (2), 275-286.
- Koide, M., Kobayashi, Y., Ninomiya, T., Nakamura, M., Yasuda, H., Arai, Y., Okahashi, N., Yoshinari, N., Takahashi, N.Udagawa, N., 2013. Osteoprotegerin-deficient male mice as a model for severe alveolar bone loss: comparison with RANKL-overexpressing transgenic male mice. *Endocrinology*, 154 (2), 773-782.
- Kuhr, A., Popa-Wagner, A., Schmoll, H., Schwahn, C.Kocher, T., 2004. Observations on experimental marginal periodontitis in rats. *Journal of periodontal research*, 39 (2), 101-106.
- Kurgan, S.Kantarci, A., 2018. Molecular basis for immunohistochemical and inflammatory changes during progression of gingivitis to periodontitis. *Periodontol 2000*, 76 (1), 51-67.
- Kwon, H.-K., Hwang, J.-S., Lee, C.-G., So, J.-S., Sahoo, A., Im, C.-R., Jeon, W. K., Ko, B. S., Lee, S. H.Park, Z. Y., 2011. Cinnamon extract suppresses experimental colitis through modulation of antigen-presenting cells. *World journal of gastroenterology: WJG*, 17 (8), 976.
- Kwon, J.-Y., Hong, S.-H., Park, S.-D., Ahn, S.-G., Yoon, J.-H., Kwon, B.-M.Kim, S.-A., 2012. 2'-Benzoyloxycinnamaldehyde inhibits nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells via regulation of AP-1 pathway. *European journal of pharmacology*, 696 (1-3), 179-186.
- Lacey, D., Timms, E., Tan, H.-L., Kelley, M., Dunstan, C., Burgess, T., Elliott, R., Colombero, A., Elliott, G.Scully, S., 1998. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *cell*, 93 (2), 165-176.

- Lamont, R. J., Koo, H.Hajishengallis, G., 2018. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nature reviews Microbiology*, 16 (12), 745-759.
- Lang, M., Ferron, P.-J., Bursztyka, J., Montjarret, A., Duteil, E., Bazire, A.Bedoux, G., 2019. Evaluation of immunomodulatory activities of essential oils by high content analysis. *Journal of biotechnology*, 303, 65-71.
- Lanyon, L. E., Goodship, A. E., Pye, C.MacFie, J., 1982. Mechanically adaptive bone remodelling. *Journal of biomechanics*, 15 (3), 141-154.
- Lasic, D. D.Papahadjopoulos, D. (1998). *Medical applications of liposomes*: Elsevier.
- Lee, H.-H., Shin, J.-S., Lee, W.-S., Ryu, B., Jang, D. S.Lee, K.-T., 2016. Biflorin, isolated from the flower buds of *Syzygium aromaticum* L., suppresses LPS-induced inflammatory mediators via STAT1 inactivation in macrophages and protects mice from endotoxin shock. *Journal of natural products*, 79 (4), 711-720.
- Li, L., Bhatia, M., Zhu, Y. Z., Zhu, Y. C., Ramnath, R. D., Wang, Z. J., Anuar, F. B., Whiteman, M., Salto-Tellez, M.Moore, P. K., 2005. Hydrogen sulfide is a novel mediator of lipopolysaccharide-induced inflammation in the mouse. *Faseb J*, 19 (9), 1196-1198. doi: 10.1096/fj.04-3583fje
- Li, L., Sun, W., Wu, T., Lu, R.Shi, B., 2017. Caffeic acid phenethyl ester attenuates lipopolysaccharide-stimulated proinflammatory responses in human gingival fibroblasts via NF- $\kappa$ B and PI3K/Akt signaling pathway. *European journal of pharmacology*, 794, 61-68.
- Li, R., Liang, T., Xu, L., Li, Y., Zhang, S.Duan, X., 2013. Protective effect of cinnamon polyphenols against STZ-diabetic mice fed high-sugar, high-fat diet and its underlying mechanism. *Food and chemical toxicology*, 51, 419-425.
- Li, W., Tsubouchi, R., Qiao, S., Haneda, M., Murakami, K.Yoshino, M., 2006. Inhibitory action of eugenol compounds on the production of nitric oxide in RAW264. 7 macrophages. *Biomedical Research*, 27 (2), 69-74.
- Lima, F., De, V. F., Baima, J., Carazzato, J. G.Pereira, R., 2001. Effect of impact load and active load on bone metabolism and body composition of adolescent athletes. *Medicine and science in sports and exercise*, 33 (8), 1318-1323.
- Liu, Y., Du, H., Wang, Y., Liu, M., Deng, S., Fan, L., Zhang, L., Sun, Y.Zhang, Q., 2016. Osteoprotegerin-knockout mice developed early onset root resorption. *Journal of endodontics*, 42 (10), 1516-1522.
- Liu, Y. C., Lerner, U. H.Teng, Y. T., 2010a. Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles. *Periodontol 2000*, 52 (1), 163-206. doi: 10.1111/j.1600-0757.2009.00321.x
- Liu, Y. C. G., Lerner, U. H.Teng, Y. T. A., 2010b. Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles. *Periodontol 2000*, 52 (1), 163-206.
- Lohinai, Z., Stachlewitz, R., Szekely, A., Feher, E., Dezsi, L.Szabo, C., 2001. Evidence for the expression of cyclooxygenase-2 enzyme in periodontitis. *Life sciences*, 70 (3), 279-290.
- MacEwan, D. J., 2002. TNF ligands and receptors--a matter of life and death. *Br J Pharmacol*, 135 (4), 855-875. doi: 10.1038/sj.bjp.0704549

- Magalhães, C. B., Riva, D. R., DePaula, L. J., Brando-Lima, A., Koatz, V. L. G., Leal-Cardoso, J. H., Zin, W. A. Faffe, D. S., 2010. In vivo anti-inflammatory action of eugenol on lipopolysaccharide-induced lung injury. *Journal of Applied Physiology*, 108 (4), 845-851.
- Marchese, A., Barbieri, R., Coppo, E., Orhan, I. E., Daglia, M., Nabavi, S. F., Izadi, M., Abdollahi, M., Nabavi, S. M. Ajami, M., 2017. Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. *Critical reviews in microbiology*, 43 (6), 668-689.
- Marnett, L. J., Rowlinson, S. W., Goodwin, D. C., Kalgutkar, A. S. Lanzo, C. A., 1999. Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2 Mechanisms of catalysis and inhibition. *Journal of Biological Chemistry*, 274 (33), 22903-22906.
- Mendi, A., Yağci, B. G., Kiziloğlu, M., Saraç, N., Yilmaz, D., Uğur, A. Uçkan, D., 2017. Effects of *Syzygium aromaticum*, *Cinnamomum zeylanicum*, and *Salvia triloba* extracts on proliferation and differentiation of dental pulp stem cells. *Journal of Applied Oral Science*, 25 (5), 515-522.
- Miyauchi, M., Hiraoka, M., Oka, H., Sato, S., Kudo, Y., Ogawa, I., Noguchi, K., Ishikawa, I. Takata, T., 2004. Immuno-localization of COX-1 and COX-2 in the rat molar periodontal tissue after topical application of lipopolysaccharide. *Arch Oral Biol*, 49 (9), 739-746.
- Miyazawa, M. Hisama, M., 2003. Antimutagenic activity of phenylpropanoids from clove (*Syzygium aromaticum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (22), 6413-6422.
- Mogi, M., Ootogoto, J., Ota, N. Togari, A., 2004. Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *Journal of dental research*, 83 (2), 166-169.
- Moon, S.-E., Kim, H.-Y. Cha, J.-D., 2011. Synergistic effect between clove oil and its major compounds and antibiotics against oral bacteria. *Arch Oral Biol*, 56 (9), 907-916.
- Morita, I., 2002. Distinct functions of COX-1 and COX-2. *Prostaglandins & other lipid mediators*, 68, 165-175.
- Moro, M. G., Oliveira, M. D. d. S., Oliveira, L. R. d., Teixeira, S. A., Muscará, M. N., Spolidorio, L. C. Holzhausen, M., 2019. Effects of Selective Versus Non-Selective COX-2 Inhibition on Experimental Periodontitis. *Brazilian dental journal*, 30 (2), 133-138.
- Murakami, S., Mealey, B. L., Mariotti, A. Chapple, I. L., 2018. Dental plaque-induced gingival conditions. *Journal of clinical periodontology*, 45, S17-S27.
- Müller, R., 2009. Hierarchical microimaging of bone structure and function. *Nature Reviews Rheumatology*, 5 (7), 373.
- Müller, R. Rügsegger, P., 1996. Analysis of mechanical properties of cancellous bone under conditions of simulated bone atrophy. *Journal of biomechanics*, 29 (8), 1053-1060.
- Nabavi, S. F., Di Lorenzo, A., Izadi, M., Sobarzo-Sánchez, E., Daglia, M. Nabavi, S. M., 2015. Antibacterial effects of cinnamon: From farm to food, cosmetic and pharmaceutical industries. *Nutrients*, 7 (9), 7729-7748.

- Nagababu, E.Lakshmaiah, N., 1997. Inhibition of xanthine oxidase—xanthine—iron mediated lipid peroxidation by eugenol in liposomes. *Molecular and cellular biochemistry*, 166 (1-2), 65-71.
- Nanci, A.Bosshardt, D. D., 2006. Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontol 2000*, 40, 11-28. doi: 10.1111/j.1600-0757.2005.00141.x
- Neethirajan, S.Jayas, D. S., 2011. Nanotechnology for the food and bioprocessing industries. *Food and bioprocess technology*, 4 (1), 39-47.
- Ni, J., Yang, D., Song, L.Li, C., 2016. Protective effects of paeoniflorin on alveolar bone resorption and soft-tissue breakdown in experimental periodontitis. *Journal of periodontal research*, 51 (2), 257-264.
- Offenbacher, S., 1996. Periodontal diseases: pathogenesis. *Annals of periodontology*, 1 (1), 821-878.
- Ogata, M., Hoshi, M., Urano, S.Endo, T., 2000. Antioxidant activity of eugenol and related monomeric and dimeric compounds. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 48 (10), 1467-1469.
- Okada, H.Murakami, S., 1998. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med*, 9 (3), 248-266.
- Ozdemir, S. P., Kurtis, B., Tuter, G., Bozkurt, S., Gultekin, S. E., Senguven, B., Watanabe, K.Aydin, S., 2012. Effects of low-dose doxycycline and bisphosphonate clodronate on alveolar bone loss and gingival levels of matrix metalloproteinase-9 and interleukin-1beta in rats with diabetes: a histomorphometric and immunohistochemical study. *J Periodontol*, 83 (9), 1172-1182. doi: 10.1902/jop.2012.110459
- Page, R. C.Kornman, K. S., 1997a. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000*, 14 (1), 9-11.
- Page, R. C.Kornman, K. S., 1997b. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000*, 14, 9-11.
- Pan, W., Wang, Q.Chen, Q., 2019. The cytokine network involved in the host immune response to periodontitis. *International journal of oral science*, 11 (3), 1-13.
- Papapanou, P. N., Sanz, M., Buduneli, N., Dietrich, T., Feres, M., Fine, D. H., Flemmig, T. F., Garcia, R., Giannobile, W. V.Graziani, F., 2018. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol*, 89, S173-S182.
- The pathogenesis of periodontal diseases, 1999. *J Periodontol*, 70 (4), 457-470. doi: 10.1902/jop.1999.70.4.457
- Patrignani, P., Tacconelli, S., Sciulli, M. G.Capone, M. L., 2005. New insights into COX-2 biology and inhibition. *Brain Research Reviews*, 48 (2), 352-359.
- Peters, M.Caldwell, J., 1994. Studies on trans-cinnamaldehyde. I. The influence of dose size and sex on its disposition in the rat and mouse. *Food and Chemical Toxicology*, 32 (10), 869-876.
- Poubelle, P. E., Chakravarti, A., Fernandes, M. J., Doiron, K.Marceau, A.-A., 2007. Differential expression of RANK, RANK-L, and osteoprotegerin by synovial fluid neutrophils from patients with rheumatoid arthritis and by healthy human blood neutrophils. *Arthritis research & therapy*, 9 (2), R25.

- Prietto, N. R., Martins, T. M., dos Santos Santinoni, C., Pola, N. M., Ervolino, E., Bielemann, A. M., Leite, F. R. M., 2020. Treatment of experimental periodontitis with chlorhexidine as adjuvant to scaling and root planing. *Arch Oral Biol*, 110, 104600.
- Ramseier, C. A., Kinney, J. S., Herr, A. E., Braun, T., Sugai, J. V., Shelburne, C. A., Rayburn, L. A., Tran, H. M., Singh, A. K., Giannobile, W. V., 2009. Identification of pathogen and host-response markers correlated with periodontal disease. *J Periodontol*, 80 (3), 436-446.
- Ranasinghe, P., Pigerá, S., Premakumara, G. S., Galappaththy, P., Constantine, G. R., Katulanda, P., 2013. Medicinal properties of 'true' cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*): a systematic review. *BMC complementary and alternative medicine*, 13 (1), 275.
- Rauch, F., Glorieux, F. H., 2004. Osteogenesis imperfecta. *The Lancet*, 363 (9418), 1377-1385.
- Reza Mozafari, M., Johnson, C., Hatziantoniou, S., Demetzos, C., 2008. Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. *Journal of liposome research*, 18 (4), 309-327.
- Ross, F. P., 2006. M-CSF, c-Fms, and signaling in osteoclasts and their precursors. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1068 (1), 110-116.
- Rosset, E. M., Bradshaw, A. D., 2016. SPARC/osteonectin in mineralized tissue. *Matrix Biology*, 52, 78-87.
- Sadeghi, S., Davoodvandi, A., Pourhanifeh, M. H., Sharifi, N., ArefNezhad, R., Sahebnasagh, R., Moghadam, S. A., Sahebkar, A., Mirzaei, H., 2019. Anti-cancer effects of cinnamon: Insights into its apoptosis effects. *European journal of medicinal chemistry*.
- Sahingur, S. E., Cohen, R. E., 2004a. Analysis of host responses and risk for disease progression. *Periodontol 2000*, 34, 57-83.
- Sahingur, S. E., Cohen, R. E., 2004b. Analysis of host responses and risk for disease progression. *Periodontology 2000*, 34 (1), 57-83.
- Saladin, K. S., 2004. *Anatomy & physiology: the unity of form and function*.
- Salvemini, D., Ischiropoulos, H., Cuzzocrea, S. (2003). Roles of nitric oxide and superoxide in inflammation. *Inflammation Protocols* (pp. 291-303): Springer.
- Sanz, M., Beighton, D., Curtis, M. A., Cury, J. A., Dige, I., Dommisch, H., Ellwood, R., Giacaman, R. A., Herrera, D., Herzberg, M. C., 2017. Role of microbial biofilms in the maintenance of oral health and in the development of dental caries and periodontal diseases. Consensus report of group 1 of the Joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal disease. *Journal of clinical periodontology*, 44, S5-S11.
- Schätzle, M., Faddy, M., Cullinan, M., Seymour, G., Lang, N., Bürgin, W., Ånerud, Å., Boysen, H., Løe, H., 2009. The clinical course of chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 36 (5), 365-371.
- Schmidt, H., Pollock, J., Nakane, M., Förstermann, U., Murad, F., 1992. Ca<sup>2+</sup> calmodulin-regulated nitric oxide synthases. *Cell calcium*, 13 (6-7), 427-434.
- Sebaaly, C., Charcosset, C., Stainmesse, S., Fessi, H., Greige-Gerges, H., 2016. Clove essential oil-in-cyclodextrin-in-liposomes in the aqueous and lyophilized states:



- From laboratory to large scale using a membrane contactor. *Carbohydrate polymers*, 138, 75-85.
- Sebaaly, C., Jraij, A., Fessi, H., Charcosset, C., Greige-Gerges, H., 2015. Preparation and characterization of clove essential oil-loaded liposomes. *Food chemistry*, 178, 52-62.
- Seeman, E., 2003. Periosteal bone formation—a neglected determinant of bone strength. *New England Journal of Medicine*, 349 (4), 320-323.
- Sherry, M., Charcosset, C., Fessi, H., Greige-Gerges, H., 2013. Essential oils encapsulated in liposomes: a review. *Journal of liposome research*, 23 (4), 268-275.
- Simon, L. S., 1999. Role and regulation of cyclooxygenase-2 during inflammation. *The American journal of medicine*, 106 (5), 37S-42S.
- Smith, W. L., Garavito, R. M., DeWitt, D. L., 1996. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and- 2. *Journal of Biological Chemistry*, 271 (52), 33157-33160.
- Sojod, B., Chateau, D., Mueller, C. G., Babajko, S., Berdal, A., Lézot, F., Castaneda, B., 2017. RANK/RANKL/OPG signalization implication in periodontitis: new evidence from a RANK transgenic mouse model. *Frontiers in Physiology*, 8, 338.
- Sokos, D., Everts, V., De Vries, T., 2015. Role of periodontal ligament fibroblasts in osteoclastogenesis: a review. *Journal of periodontal research*, 50 (2), 152-159.
- Song, H.-h., Gong, X., Williams, G. R., Quan, J., Nie, H.-l., Zhu, L.-m., Nan, E.-l., Shao, M., 2014. Self-assembled magnetic liposomes from electrospun fibers. *Materials Research Bulletin*, 53, 280-289.
- Stoka, V., Turk, V., Turk, B., 2016. Lysosomal cathepsins and their regulation in aging and neurodegeneration. *Ageing research reviews*, 32, 22-37.
- Struillou, X., Boutigny, H., Soueidan, A., Layrolle, P., 2010. Experimental animal models in periodontology: a review. *The open dentistry journal*, 4, 37-47. doi: 10.2174/1874210601004010037
- Suda, K., Udagawa, N., Sato, N., Takami, M., Itoh, K., Woo, J.-T., Takahashi, N., Nagai, K., 2004. Suppression of osteoprotegerin expression by prostaglandin E2 is crucially involved in lipopolysaccharide-induced osteoclast formation. *The Journal of Immunology*, 172 (4), 2504-2510.
- Suda, T., Takahashi, N., Udagawa, N., Jimi, E., Gillespie, M. T., Martin, T. J., 1999. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocrine reviews*, 20 (3), 345-357.
- Sundaram, K., Rao, D. S., Ries, W. L., Reddy, S. V., 2013. CXCL5 stimulation of RANK ligand expression in Paget's disease of bone. *Laboratory investigation*, 93 (4), 472.
- Takayanagi, H., Kim, S., Matsuo, K., Suzuki, H., Suzuki, T., Sato, K., Yokochi, T., Oda, H., Nakamura, K., Ida, N., 2002. RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos-dependent induction of interferon- $\beta$ . *Nature*, 416 (6882), 744.
- Tapiero, H., Ba, G. N., Couvreur, P., Tew, K., 2002. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 56 (5), 215-222.

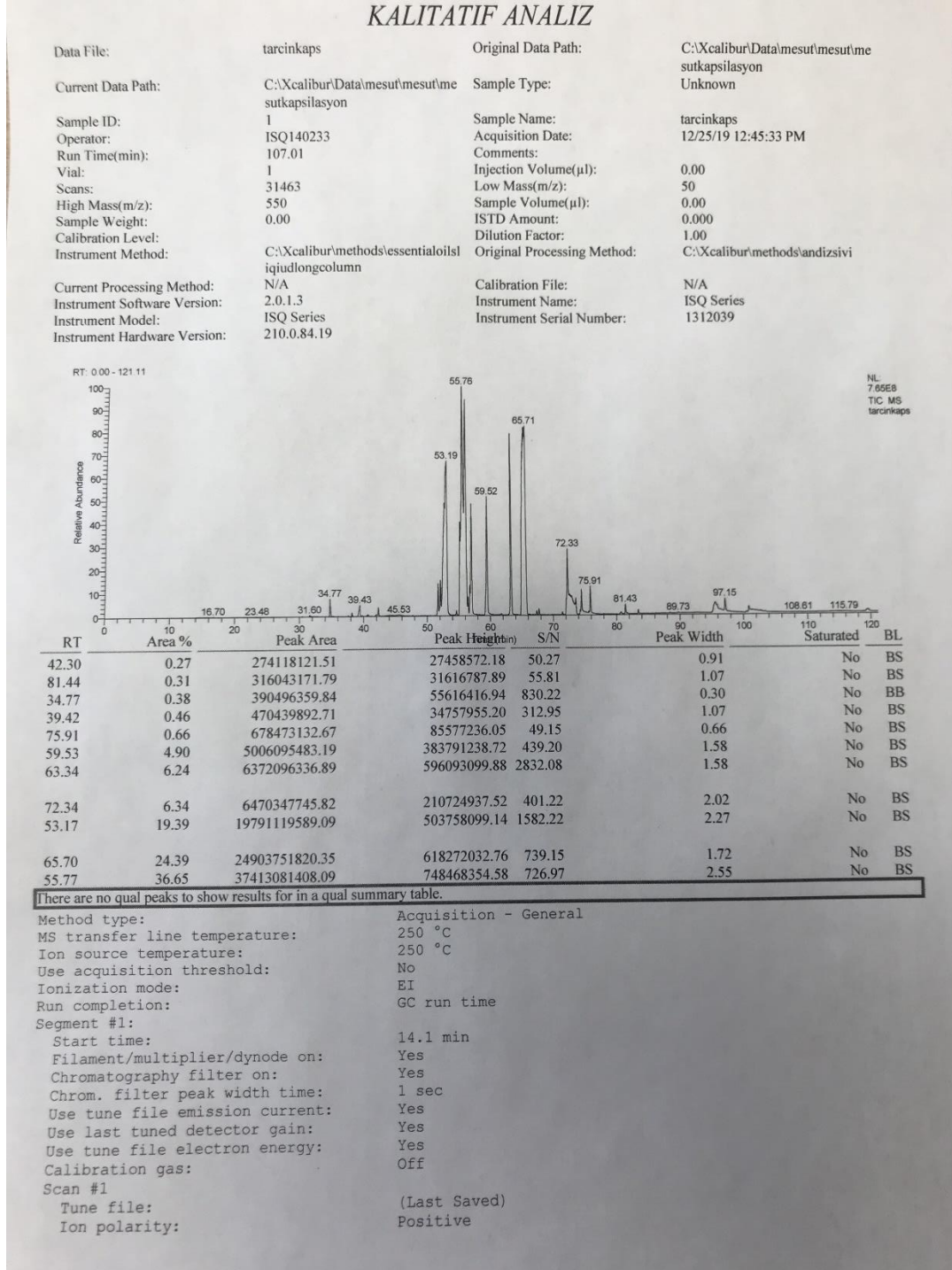
- Taubman, M. A., Valverde, P., Han, X.Kawai, T., 2005. Immune response: the key to bone resorption in periodontal disease. *J Periodontol*, 76, 2033-2041.
- Teitelbaum, S. L., 2000. Bone resorption by osteoclasts. *Science*, 289 (5484), 1504-1508.
- Theill, L. E., Boyle, W. J.Penninger, J. M., 2002. RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. *Annual review of immunology*, 20 (1), 795-823.
- 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 (6), 1089-1094. doi: 10.1902/jop.2008.070462
- Toker, H., Ozdemir, H., Balci, H.Ozer, H., 2012. N-acetylcysteine decreases alveolar bone loss on experimental periodontitis in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of periodontal research*. doi: 10.1111/j.1600-0765.2012.01497.x
- 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 (4), 672-678. doi: 10.1902/jop.2009.080509
- Tonetti, M. S.Chapple, I. L., 2011. Biological approaches to the development of novel periodontal therapies--consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *Journal of clinical periodontology*, 38 Suppl 11, 114-118. doi: 10.1111/j.1600-051X.2010.01675.x
- Tonetti, M. S., Greenwell, H.Kornman, K. S., 2018. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *Journal of clinical periodontology*, 45, S149-S161.
- Trombelli, L., Farina, R., Silva, C. O.Tatakis, D. N., 2018. Plaque-induced gingivitis: Case definition and diagnostic considerations. *Journal of clinical periodontology*, 45, S44-S67.
- Tsevis, K., Trakakis, E., Pergialiotis, V., Alhazidou, E., Peppas, M., Chrelias, C., Papantoniou, N.Panagopoulos, P., 2018. The influence of thyroid disorders on bone density and biochemical markers of bone metabolism. *Hormone molecular biology and clinical investigation*, 35 (1).
- Tsuji-Naito, K., 2008. Aldehydic components of cinnamon bark extract suppresses RANKL-induced osteoclastogenesis through NFATc1 downregulation. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 16 (20), 9176-9183.
- Turk, V., Stoka, V., Vasiljeva, O., Renko, M., Sun, T., Turk, B.Turk, D., 2012. Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1824 (1), 68-88.
- Van Lint, P.Libert, C., 2007. Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation. *Journal of leukocyte biology*, 82 (6), 1375-1381.
- Vardar, S., Baylas, H.Huseyinov, A., 2003. Effects of selective cyclooxygenase-2 inhibition on gingival tissue levels of prostaglandin E2 and prostaglandin F2 $\alpha$  and clinical parameters of chronic periodontitis. *J Periodontol*, 74 (1), 57-63.
- Vasconcelos, N., Croda, J.Simionatto, S., 2018. Antibacterial mechanisms of cinnamon and its constituents: A review. *Microbial pathogenesis*, 120, 198-203.
- Venugopal, P., Koshy, T., Lavu, V., Ranga Rao, S., Ramasamy, S., Hariharan, S.Venkatesan, V., 2018. Differential expression of microRNAs let-7a, miR-

- 125b, miR-100, and miR-21 and interaction with NF- $\kappa$ B pathway genes in periodontitis pathogenesis. *Journal of cellular physiology*, 233 (8), 5877-5884.
- Vignery, A., 2000. Osteoclasts and giant cells: macrophage–macrophage fusion mechanism. *International journal of experimental pathology*, 81 (5), 291-304.
- Visse, R., Nagase, H., 2003. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation research*, 92 (8), 827-839.
- Wada, N., Maeda, H., Tanabe, K., Tsuda, E., Yano, K., Nakamura, H., Akamine, A., 2001. Periodontal ligament cells secrete the factor that inhibits osteoclastic differentiation and function: the factor is osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor. *Journal of periodontal research*, 36 (1), 56-63.
- Wang, Y., Zhang, Y., Shi, Y.-q., Pan, X.-h., Lu, Y.-h., Cao, P., 2018. Antibacterial effects of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) bark essential oil on *Porphyromonas gingivalis*. *Microbial pathogenesis*, 116, 26-32.
- Weinberg, M. A., Bral, M., 1999. Laboratory animal models in periodontology. *J Clin Periodontol*, 26 (6), 335-340.
- Weiner, S., Wagner, H. D., 1998. The material bone: structure-mechanical function relations. *Annual review of materials science*, 28 (1), 271-298.
- Wen, Z., Liu, B., Zheng, Z., You, X., Pu, Y., Li, Q., 2010. Preparation of liposomes entrapping essential oil from *Atractylodes macrocephala* Koidz by modified RESS technique. *Chemical Engineering Research and Design*, 88 (8), 1102-1107.
- Weng, S.-J., Yan, D.-Y., Tang, J.-H., Shen, Z.-J., Wu, Z.-Y., Xie, Z.-J., Yang, J.-Y., Bai, B.-L., Chen, L., Boodhun, V., 2019. Combined treatment with Cinnamaldehyde and  $\beta$ -TCP had an additive effect on bone formation and angiogenesis in critical size calvarial defect in ovariectomized rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 109, 573-581.
- Willoughby, D. A., Moore, A. R., Colville-Nash, P. R., 2000. COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. *The Lancet*, 355 (9204), 646-648.
- Winkler, D. G., Sutherland, M. K., Geoghegan, J. C., Yu, C., Hayes, T., Skonier, J. E., Shpektor, D., Jonas, M., Kovacevich, B. R., Staehling-Hampton, K., 2003. Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *The EMBO journal*, 22 (23), 6267-6276.
- Wińska, K., Mączka, W., Łyczko, J., Grabarczyk, M., Czubaszek, A., Szumny, A., 2019. Essential Oils as Antimicrobial Agents—Myth or Real Alternative? *Molecules*, 24 (11), 2130.
- Wu, Z., Weng, S., Yan, D., Xie, Z., Zhou, Q., Li, H., Bai, B., Boodhun, V., Shen, Z., Tang, J., 2018. Administration of cinnamaldehyde promotes osteogenesis in ovariectomized rats and differentiation of osteoblast in vitro. *Journal of pharmacological sciences*, 138 (1), 63-70.
- Xie, Q. w., Nathan, C., 1994. The high-output nitric oxide pathway: role and regulation. *Journal of leukocyte biology*, 56 (5), 576-582.
- Yang, M., Li, L., Soh, Y., Heo, S. M., 2019. Effects of omega-3 fatty acids and aspirin on *Porphyromonas gingivalis*-induced periodontitis in rats. *J Periodontol*.

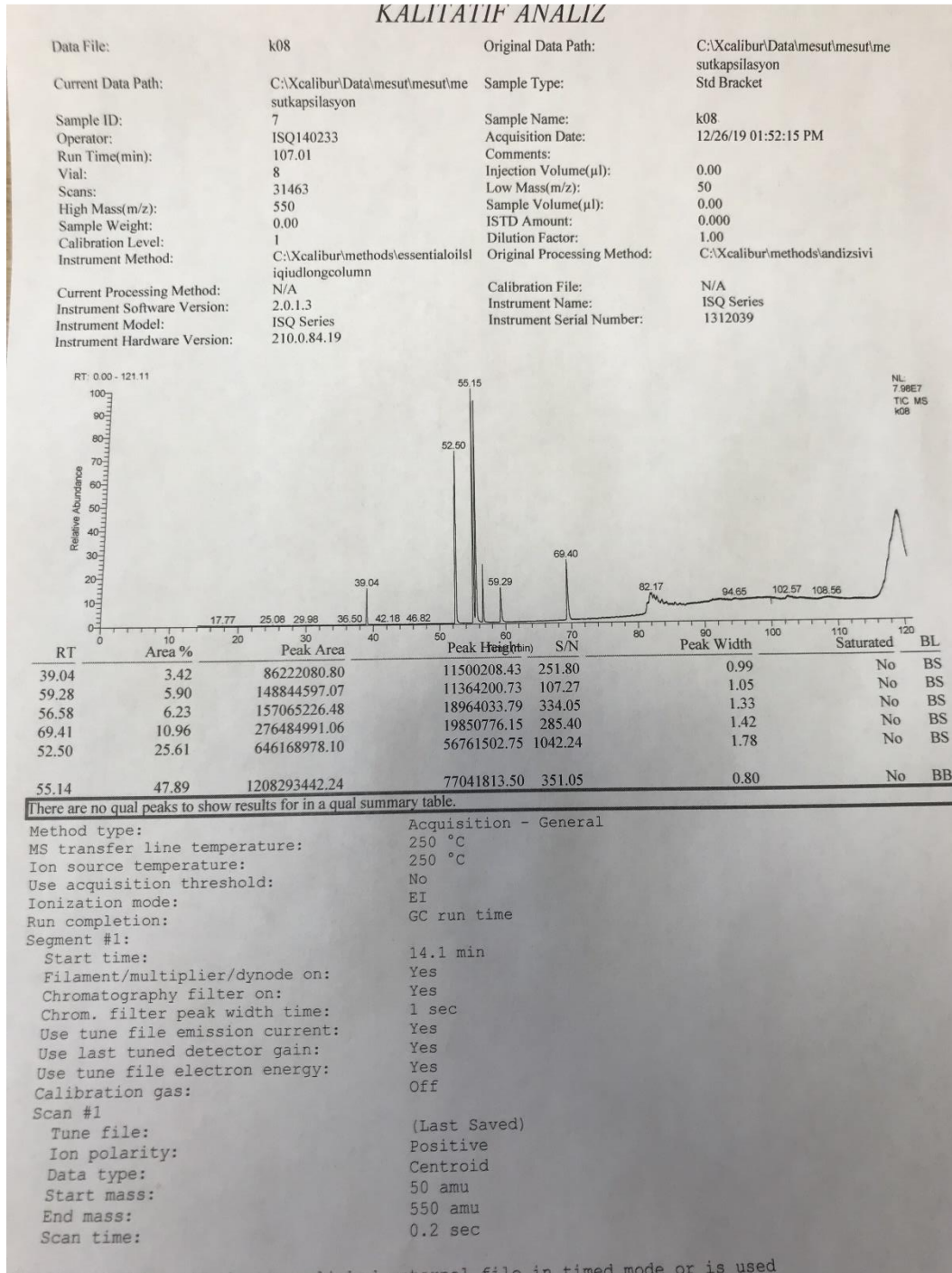
- Yen, C. A., Damoulis, P. D., Stark, P. C., Hibberd, P. L., Singh, M.Papas, A. S., 2008. The effect of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor (celecoxib) on chronic periodontitis. *J Periodontol*, 79 (1), 104-113.
- Yogalakshmi, B., Viswanathan, P.Anuradha, C. V., 2010. Investigation of antioxidant, anti-inflammatory and DNA-protective properties of eugenol in thioacetamide-induced liver injury in rats. *Toxicology*, 268 (3), 204-212.
- Zhang, N., Lv, H., Shi, B.-H., Hou, X.Xu, X., 2017. Inhibition of IL-6 and IL-8 production in LPS-stimulated human gingival fibroblasts by glycyrrhizin via activating LXR $\alpha$ . *Microbial pathogenesis*, 110, 135-139.
- Zhang, X.-W., Zhou, C., Zhu, H.-D., Shao, W., You, Y., Peng, J., Yin, S.Shen, X., 2014. Inhibition of osteoclastogenesis by 6-[10'(Z)-heptadecenyl] salicylic acid from *Syzygium tetragonum* Wall via preventing nuclear translocation of NFATc1. *Phytomedicine*, 21 (7), 960-965.
- Zhang, Y., Wang, Y., Zhu, X., Cao, P., Wei, S.Lu, Y., 2017. Antibacterial and antibiofilm activities of eugenol from essential oil of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & LM Perry (clove) leaf against periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Microbial pathogenesis*, 113, 396-402.
- Zhang, Z., Yuan, W., Deng, J., Wang, D., Zhang, T., Peng, L., Tian, H., Wang, Z.Ma, J., 2020. Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) regulates neutrophils infiltration and periodontal tissue destruction in an experimental periodontitis. *Molecular immunology*, 117, 110-121.
- Zhong, W., Peng, Y., Yue, E., Huang, B., Zhang, W., Zhao, Z., Jiang, J., Wang, Q.Zhao, H., 2019. Gingival crevicular fluid levels of SLIT3 are increased in periodontal disease. *Oral diseases*.
- Zhu, R., Liu, H., Liu, C., Wang, L., Ma, R., Chen, B., Li, L., Niu, J., Fu, M.Zhang, D., 2017. Cinnamaldehyde in diabetes: A review of pharmacology, pharmacokinetics and safety. *Pharmacological research*, 122, 78-89.

## 7. EKLER

### EK 1: Tarçın yağı gaz kromatografi sonuçları



## EK 2: Karanfil yağı gaz kromatografi sonuçları



## 8. ÖZGEÇMİŞ

HATİCE BALCI YÜCE

**E-Posta Adresi** : [hatice.balciyuce@gop.edu.tr](mailto:hatice.balciyuce@gop.edu.tr),  
**Telefon (İş)** : 3562124222-7064  
**Telefon (Cep)** : 5079418224  
**Faks** : 3562124225  
**Adres** :

### Öğrenim Bilgisi

Doktora

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

2015-2020

Doktora

CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ

2008-2012

Lisans

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ

2002-2007