DENEYSEL OLARAK PERİODONTİTİS OLUŞTURULMUŞ RATLARDA MELATONİNİN PSİKOLOJİK STRES İLİŞKİLİ PERİODONTAL DOKU YIKIMI ÜZERİNE ÖNLEYİCİ ETKİLERİ

Dt. Semih Alperen BOSTAN
Periodontoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Oğuz KÖSE

Uzmanlık Tezi-2021

T.C.

RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ

DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

DENEYSEL OLARAK PERİODONTİTİS OLUŞTURULMUŞ RATLARDA MELATONİNİN PSİKOLOJİK STRES İLİŞKİLİ PERİODONTAL DOKU YIKIMI ÜZERİNE ÖNLEYİCİ ETKİLERİ

Dt. Semih Alperen BOSTAN

Periodontoloji Programı

Uzmanlık Tezi

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Oğuz KÖSE

RİZE - 2021

T.C.

RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ

DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

PERİODONTOLOJİ UZMANLIK EĞİTİM PROGRAMI

DENEYSEL OLARAK PERİODONTİTİS OLUŞTURULMUŞ RATLARDA MELATONİNİN PSİKOLOJİK STRES İLİŞKİLİ PERİODONTAL DOKU YIKIMI ÜZERİNE ÖNLEYİCİ ETKİLERİ

Dt. Semih Alperen BOSTAN

Tez Savunma Tarihi : 27.09.2021

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Oğuz KÖSE
(Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Cenk Fatih ÇANAKÇI
(Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Meltem ZİHNİ KORKMAZ
(Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Hatice YEMENOĞLU
(Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi)

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Zeynep YEŞİL DUYMUŞ

Fakülte Dekanı

Uzmanlık Tezi

RİZE – 2021

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR ..... **IV**

ÖZET ..... **V**

ABSTRACT ..... **VII**

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **IX**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **XIII**

TABLO DİZİNİ ..... **XV**

1. GİRİŞ **1**

2. GENEL BİLGİLER **4**

2.1.Periodontal Hastalıklar 4

2.1.1.Periodontal ve Peri-İmplant Hastalıkların Sınıflandırılması 5

2.1.2. Periodontal Sağlık 6

2.1.3. Gingivitis 7

2.1.4. Periodontitis 8

2.2.Oksidan ve Antioksidan Sistem 29

2.2.1. Malondialdehit 30

2.2.2. Glutatyon 30

2.2.3. Total Antioksidan Kapasite, Total Oksidatif Durum ve Oksidatif Stress İndexi 31

2.2.4. Reaktif Oksijen Türlerinin Periodontitis Patogenezindeki Rolü 32

2.3. Stres 33

2.4.Periodontitis ve Stres 35

2.5. Melatonin 38

2.5.1. Melatonin Hormonu ve Özellikleri 38

2.5.2. Melatonin Hormonunun Etkileri 39

2.6. Melatonin ve Periodontitis 42

2.7. Stres ve Melatonin 44

3. MATERYAL VE METOD 46

3.1. Deney Hayvanlarının Temini ve Barındırılması 46

3.1.1. Çalışma Grupları 47

3.2. Ligatür ile Periodontitis İndüksiyonu 49

3.3. Restraint (kısıtlama) stres deney protokolü 51

3.4.Melatonin Uygulanması 52

3.5. Örneklerin toplanması ve hazırlanması 52

3.6. Alveolar Kemik Kayıplarının Belirlenmesi 54

3.6.1 Histomorfometrik Analiz 54

3.7. Histopatolojik Analizler 55

3.7.1. Histolojik Doku Takibi Prosedürü 55

3.7.2. Hematoksilen-Eozin ile Boyama Prosedürü 58

3.7.3. Histopatolojik Analiz 60

3.7.4. İmmünohistokimyasal Analiz 61

3.8. Biyokimyasal Analizler 63

3.8.1. Çalışmada kullanılan araç ve gereçler 63

3.8.2. Kullanılan kimyasal materyaller ve marka Adları 63

3.8.3. Doku homojenatlarının hazırlanması 64

3.8.4. Doku İnflamatuar Sitokin ve Enzim Düzeylerinin Belirlenmesi 65

3.8.5. Doku Oksidan-Antioksidan Parametrelerinin İncelenmesi 70

3.8.6. Kortikosteron (CORT) Düzeylerinin Elisa Kitiyle Belirlenmesi 75

3.9.Fizyolojik Analizler 76

3.9.1.Açık alan testi (OFT) 76

3.10. İstatiksel Analiz..... 78

4.BULGULAR 80

4.1.Morfometrik Bulgular (Alveolar Kemik Kayıpları)..... 80

4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular 82

4.2.1. Doku RANKL, OPG, RANKL/OPG Bulguları 82

4.3. Biyokimyasal Bulgular..... 86

4.3.1. Doku Proinflamatuar ve Antiinflamatuar Sitokin ve Enzim Bulguları 86

4.3.2. Doku Oksidan - Antioksidan Parametrelerin Bulguları 91

4.3.3. Serum Kortikosteron Bulguları 94

4.4. Fizyolojik Bulgular 94

4.4.1. Açık Alan Testi bulguları..... 94

5.TARTIŞMA 98

6. SONUÇ VE ÖNERİLER 128

KAYNAKLAR 131

EKLER..... 151

EK-1-Özgeçmiş..... **151**

TEŞEKKÜR

Başta, gerek uzmanlık eğitimimde gerekse mesleki hedeflerimde belirleyici olan, geniş bilgi birikimi ile klinik tecrübelerini esirgemeyen tez danışman hocam Doç. Dr. Oğuz KÖSE'ye

Uzmanlık eğitimim süresince kliniğimizde bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım değerli hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Meltem ZİHNİ KORKMAZ, Dr. Öğr. Üyesi Hatice YEMENOĞLU'na ve Dr. Öğr. Üyesi Sevda KURT BAYRAKDAR'a

Tez kapsamında titizlikle gerçekleştirilen biyokimyasal çalışmalar için Prof. Dr. Adnan YILMAZ ve Öğr. Gör. Kerimali AKYILDIZ'a ve histolojik çalışmalar için Prof. Dr. Levent TÜMKAYA ve Doç. Dr. Tolga MERCANTEPE'ye,

Beraber uyumla çalıştığım, sevgi ve dostlukları ile destek olan başta Ahmet ALTIN olmak üzere tüm asistan arkadaşlarıma,

İyi günde, kötü günde yılmadan yanımda duran, hayattaki mutluluğum eşime ve aramıza katılmasını sabırsızlıkla beklediğim oğlumuza,

Benim için gösterdikleri özveri ve inançlarıyla yetişmemde büyük emekleri olan, yoğun eğitim dönemim boyunca sabırla beni destekleyen sevgili anneme ve abime,

Bana bilim ve öğrenmenin önemini öğreten, bugün hayatta olmasa da yaşantısı ve düşünceleriyle yüreğimde her an hissettiğim canım babama,

Sonsuz teşekkürler…

ÖZET

Deneysel Olarak Periodontitis Oluşturulmuş Ratlarda Melatoninin Psikolojik Stres İlişkili Periodontal Doku Yıkımı Üzerine Önleyici Etkileri

Amaç: Bu hayvan çalışmasının iki temel amacı stres ilişkili periodontitisin periodontal yapı üzerine muhtemel etkileri ile sistemik melatonin uygulamasının önleyici etkinliğini kapsamlı olarak araştırmak idi.

Materyal ve Metod: 48 erkek Sprague-Dawley rat rastgele altı gruba ayrıldı: kontrol, restraint stres (S), deneysel periodontitis (Dp), restraint stres-deneysel periodontitis (S-Dp), restraint stres-melatonin (S-Mel), restraint stres-deneysel periodontitis-melatonin (S-Dp-Mel). Periodontitis, sağ-sol alt 1.molar dişlerin boyunlarına sub-paramarjinal pozisyonda 3.0 ipek sütur yerleştirilmesi ve süturun yerinde 5 hafta süre ile muhafazası yoluyla indüklendi. Ligatürleme ile eş zamanlı olarak restraint stres uygulandı. Ligatürleme ve restraint stres uygulamalarını takip eden 21. günden başlayarak intraperitoneal olarak melatonin ve taşıyıcı (Kontrol, S, Dp, S-Dp grupları) uygulamaları (10 mg/vücut ağırlığı/gün, 14 gün) gerçekleştirildi. Çalışmanın 42. gününde tüm gruplara açık alan testi uygulandı. Ratların ötenazisi öncesi serum örnekleri, ötenaziyi takiben mandibular doku örnekleri alındı. Periodontal kemik kaybı histolojik kesitlerle ölçüldü. Serum örneklerinde kortikosteron seviyeleri ölçüldü. Sağ mandibular doku örneklerinde histopatolojik ve immünohistokimyasal (RANKL, OPG), sol mandibular doku örneklerinde ise biyokimyasal (MDA, GSH, TOD, TAOK, OSİ, IL-1β, IL-10, IL-1ß / IL-10,MMP-8, MMP-9 seviyeleri) değerlendirmeler yapıldı.

Bulgular: Melatonin, restraint stresin kortikosteron düzeyi ve açık alan testi parametrelerinde meydana getirdiği artışı belirgin olarak kısıtladı ($p<0,05$). Restraint stres ilişkili periodontitisli ratların periodontal dokularında belirgin olarak yüksek tespit

edilen alveolar kemik kaybı, kemik yıkımından sorumlu moleküller (RANKL/OPG), proinflamatuar sitokinler (IL-1ß / IL-10), proteaz (MMP-8, MMP-9) ve oksidatif stres (OSİ) düzeylerini ise baskıladığı tespit edildi ($p<0,05$).

Sonuç: Sistemik melatonin uygulaması stresin periodontal dokulardaki sınırlı düzeydeki yıkıcı etkilerini belirgin bir şekilde önleyebilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Restraint stres, deneysel periodontitis, melatonin, oksidatif stress, matriks metalloproteinaz

ABSTRACT

Preventive Effects Of Melatonin On Psychological Stress-Related Periodontal Tissue Destruction In Rats With Experimental Periodontitis

Objective: The two main goals of this animal study were to exhaustively investigate the possible effects of stress-related periodontitis on periodontal structure and the preventive effectiveness of systemic melatonin administration.

Materials and Method: 48 male Sprague-Dawley rats were randomly divided into six groups: control, restraint stress (S), experimental periodontitis (Dp), restraint stress-experimental periodontitis (S-Dp), restraint stress-melatonin (S-Mel), restraint stress-experimental periodontitis-melatonin (S-Dp-Mel). Periodontitis was induced by placing 3.0 silk sutures on the necks of the right-left mandibular first molars in a sub-paramarginal position and keeping the suture in place for 5 weeks. Restraint stress was applied concurrently with ligation. Starting from the 21st day following the ligature and restraint stress applications, intraperitoneal melatonin and carrier (Control, S, Dp, S-Dp groups) applications (10 mg/body weight/day, 14 days) were performed. On the 42nd day of the study, open field test was applied to all groups. Serum samples were taken before euthanasia of rats, and mandibular tissue samples were taken following euthanasia. Periodontal bone loss was measured by histological sections. Corticosterone levels were measured in serum samples. Histopathological and immunohistochemical (RANKL, OPG) in right mandibular tissue samples, biochemical (MDA, GSH, TOD, TAOK, OSI, IL-1β, IL 10, IL-1ß / IL-10, MMP-8, MMP-9 levels) in left mandibular tissue samples evaluations were made.

Results: Melatonin significantly limited the increase in corticosterone levels and open field test parameters of restraint stress ($p<0.05$). Restraint stress-associated periodontitis,

alveolar bone loss was significantly higher in the periodontal tissues of rats was detected, responsible for bone molecules (RANKL/OPG), proinflammatory cytokines (IL-1ß / IL-10), proteases (MMP-8, MMP-9) and oxidative stress (OSI) were found to suppress the levels increase ($p<0.05$).

Conclusion: Systemic melatonin administration can significantly prevent the limited destructive effects of stress on periodontal tissues.

Keywords: Restraint stress, experimental periodontitis, melatonin, oxidative stress, matrix metalloproteinase

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C : Santigrat derece

µA : Mikroamper

µl : Mikrolitre

µm : Mikrometre

μm^2 : Mikrometrekare

µmol : Mikromol

8-OhdG : 8-hidroksideoksi-guanozin

ABD : Amerika Birleşik Devletleri

ACTH : Adrenokortikotropin Hormon

AK : Alveolar Kret

ANOVA : Varyans analizi

cm^3 : Santimetreküp

CORT : Kortikosteron

CRH : Kortikotropin Salgılattırıcı Hormon

CRP : C reaktif proteini

dk : Dakika

dl : Desilitre

DM : Diabetes mellitus

DNA : Deoksiribo nükleik asit

DOS : Dişeti oluğu sıvısı

Dp : Deneysel periodontitis

DTNB : 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoik asit

ECM : Ekstra Selüler Matriks

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

FÇ : Furkasyon çatısı

FAK : Furkasyonel alveolar kret

g : Santrifüj kuvveti

Gİ : Gingival index

gr : Gram

GSH : Glutatyon

H&E : Hematoksilen-Eozin

H_2O_2 : Hidrojen peroksit

HbA1c : Hemoglobin A1c

hsCRP : Yüksek duyarlılıklı C reaktif protein

ICAM-1 : Hücreler arası adezyon molekülü-1

IL-1 : İnterlökin-1

IL-1β : İnterlökin-1 beta

IL-6 : İnterlökin-6

IL-8 : İnterlökin-8

IL-10 : İnterlökin-10

INF-γ : İnterferon gama

K_2HPO_4 : Dipotasyum hidrojen fosfat

KAK : Klinik ataşman kaybı

KAT : Katalaz

kcal : Kilokalori

kg : Kilogram

KH_2PO_4 : Potasyum hidrojen fosfat

kV : Kilovolt

LOOH : Lipit hidroperoksit

LPS : Lipopolisakkarit

M : Molar

MAC : Membran atak kompleksi

M-CSF : Makrofaj koloni stimüle edici faktör

MDA : Malondialdehit

MDP : Mikrobiyal dental plak

Mel : Melatonin

MSS : Mine sement sınırı

MMP : Matriksmetallo proteinaz

mg : Miligram

ml : Mililitre

mM : Milimolar

MT : Melatonin reseptörü

Na_2CO_3 : Sodyum karbonat

Na_2HPO_4 : Disodyum hidrojen fosfat

NaCl : Sodyum klorür

NaH_2PO_4 : Monosodyum fosfat

NF-kβ : Nükleer faktör kappa beta

NO : Nitrik oksit

Ng : Nanogram

NK : Doğal öldürücü hücreler

Nm : nanometre

nmol : nanomol

O_2 : Tekli oksijen

O_2^- : Süperoksit radikali

OH^- : Hidroksil radikali

OFT : Open field test

OPG : Osteoprotegerin

OSİ : Oksidatif stres indexi

PBS : Fosfat tamponlu salin

Ph : Power of hydrogen

PMNL : Polimorf nüveli lökosit

RANK : Reseptör aktivatör nükleer faktör kappa B

RANKL : Reseptör aktivatör nükleer faktör kappa B ligandı

ROT : Reaktif oksijen türleri

rpm : Dakikada dönme sayısı

RTEÜ : Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi

S : Restraint stres

Sn : Saniye

SOD : Süperoksit dismutaz

SSPS : İstatistiksel Analiz Yazılımı

TAOK : Total antioksidan kapasite

TBA : Tiyobarbitürik asit

TCA : Tiyokarboksilik asit

Th1 : T helper 1

TIMP : Matrix metalloproteinaz doku inhibitörü

TLR : Toll-like reseptör

TNF-α : Tümör nekroz faktörü

TOD : Total oksidatif durum

VCAM : Vasküler hücre adezyon molekülü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Deney şeması……..……49

Şekil 3.2. Ratlara ligatür uygulanması (1)……...……50

Şekil 3.3. Ratlara ligatür uygulanması (2)……...……50

Şekil 3.4. Restraint Stres kafesleri…….…….....…..…52

Şekil 3.5. -80 Derin dondurucu……...…53

Şekil 3.6. Gingival dokuların çıkarılması …….....…..54

Şekil 3.7. Alveolar kemik kayıplarının histomorfometrik olarak ölçülmesi …..……55

Şekil 3.8. Doku takip cihazı……56

Şekil 3.9. Parafin bloklama…….56

Şekil 3.10.Rotary mikotom……...……...57

Şekil 3.11. Hematoksilen Eozin boyama…….57

Şekil 3.12. Etüv……...59

Şekil 3.13. İmmünohistokimya boyama cihazı …..……62

Şekil 3.14. Supernatantların Elisa kitiyle incelenmesi...…….73

Şekil 3.15. Elisa yıkayıcı cihaz……74

Şekil 3.16. Elisa okuyucu cihaz…….....74

Şekil 3.17. OFT protokolünün uygulandığı pleksiglass kabin ……...……78

Şekil 3.18. Anymaze programı……78

Şekil 4.1. Alveolar kemik kayıplarının histolojik kesitler üzerinde değerlendirilmesi …….....82

Şekil.4.2. Histolojik kesitler üzerinde RANKL pozitif hücreler……..…..84

Şekil.4.3. Histolojik kesitler üzerinde OPG pozitif hücreler……..85

Şekil.4.4. RANKL, OPG, RANKL/OPG seviyelerinin gruplar arasında karşılaştırılması …….....86

Şekil.4.5. IL-1ß, IL-10, IL-1ß/IL-10 seviyelerinin gruplar arasında karşılaştırılması ……89

Şekil.4.6. MMP-8, MMP-9 seviyelerinin gruplar arasında karşılaştırılması…….....90

Şekil.4.7. MDA, GSH seviyelerinin gruplar arasında karşılaştırılması…….....92

Şekil.4.8. TOD, TAOK, OSİ seviyelerinin gruplar arasında karşılaştırılması……93

TABLO DİZİNİ

Tablo 2.1. Periodontal ve Peri-implant Hastalık ve Durumlarının Sınıflandırılması…..6

Tablo 2.2.Periodontitis Evreleri…..…..…..…..…..…..…..…..…..…..…..…..……12

Tablo 2.3. Periodontitisin derecelendirilmesi..…..…..…..…..…..…..…..…..…..…….14

Tablo 3.1 Deney hayvanlarına verilen standart pellet rat yeminin içeriği…..…..……...47

Tablo 3.2. Mandibula dokusuna ait doku takibi işlemi..…..…..…..…..…..…..…..…...58

Tablo 3.3. Hematoksilen eozin boyama prosedürü..…..…..…..…..…..…..…..…...60

Tablo 3.4. Biyokimya laboratuvarında kullanılan cihazlar ve marka adları…..…..…...64

Tablo 4.1. Alveoler kemik kayıplarının gruplar arasında karşılaştırılması…..…..….....81

Tablo 4.2 Kortikosteron seviyelerinin gruplar arasında karşılaştırılması…..…..……94

Tablo 4.3. Açık Alan testi parametrelerinin gruplar arasında karşılaştırılması..…….....97

1. GİRİŞ

Periodontitis, diş destek dokularının enflamasyonu ile başlayan ve tedavi edilmediği takdirde hastalığın ilerlemesi ile birlikte ataşman, kemik ve nihayet diş kaybına neden olabilen inflamatuar, multifaktöriyel, kronik bir hastalıktır.[1] Bunun yanı sıra periodontitisin yalnızca ağız sağlığını etkileyen basit bir ağız hastalığı olmadığı, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve romatoid artrit gibi sistemik hastalıklar yanı sıra hamilelik süreci ve sonuçlarını da etkilediği açıkça gösterilmiştir.[2, 3]

Her ne kadar periodontitisin primer etiyolojik faktörü mikrobiyal dental plak (MDP) olsa da klinik olarak gözlenen doku yıkımının büyük bir bölümü proinflamatuar konak cevabından kaynaklanmaktadır. [4] Bu bağlamda, konak yanıtını etkileyen sistemik hastalıklar ve durumlar periodontitisin klinik seyrini doğrudan etkilemektedirler. Periodontal hastalıklar için risk faktörü olduğu bilinen sigara ve diyabet (DM) konak cevabını modifiye ederek hastalığın ilerlemesini, şiddetini ve sonuçlarını etkiler.[5]

Stres, yeni durumlarla karşılaşıldığında kişinin bedensel ve ruhsal sınırlarının zorlanması sonucu vücutta ortaya çıkan bazı mekanizmalarla kendini gösteren bir uyum sağlama reaksiyonudur. Bu varoluşsal savunma yanıtında mücadele etme (savaş) veya kaçma tepkisi söz konusudur.[6] Psikolojik stresin kardiyovasküler, metabolik ve romatolojik hastalıklardaki rolu yanı sıra otoimmün ve neoplastik etiyolojiye sahip kronik hastalıklarda da inflamatuar cevabı provoke edici önemli bir çevresel risk etkeni olduğu bilinmektedir. [7, 8] Psikolojik stres periodontal hastalıklar için kesin olarak bir risk faktörü değil ise de risk indikatörü olarak tanımlanmıştır.[9] Stres, periodontitis ve diğer enflamatuar periodontal hastalıkların şiddetlenmesiyle nedensel olarak ilişkili, değiştirilebilir potansiyel bir risk faktörüdür.[10] Güncel literatürde periodontitis ve psikolojik stres arasındaki ilişkiyi gösteren birçok epidemiyolojik[9, 11-13] ve hayvan

çalışmaları [14-16] bulunmaktadır. Dahası, psikolojik stres altındaki bireylerde cerrahisiz periodontal tedavi başarısı, stressiz bireylere kıyasla düşük bulunmuştur.[17, 18] Klinik gözlemler ve epidemiyolojik çalışmalar göstermiştir ki; psikolojik faktörler periodontitis gelişmesine olan yatkınlığı arttırabilir.

Stresin inflamatuar hastalıklar üzerindeki etkisinin daha çok nöroendokrin sistem salgılarının nötrofil, lenfosit ve makrofaj fonksiyonlarını modüle etmesi yoluyla gerçekleştiği düşünülmektedir[19, 20]. Strese bağlı oluşan fizyolojik yanıtlardan biri hipotalamo- pitüer-adrenal (HPA) aksın aktive edilmesidir. Bu aksın aktive olması hipotalamustan kortikotropin salgılattırıcı hormon (CRH), pitüer bezden adrenokortiktropin salgılattırıcı hormon (ACTH), adrenal korteksten glukokortikoid hormonların salınımını teşvik eder. Temel mekanizma olarak HPA aksında gözlenen düzensizlikler ise immün cevabı etkilemektedir. Kronik stres durumunda yüksek düzeyde salınan kortizol, akut stres durumdaki immünsüpresif fonksiyonunun aksine immün yanıtı regüle edemez ve proinflamatuar sitokinlerin aşırı salınımı ile karakterize yıkıcı konak yanıtını şiddetlenir.[7, 21] Strese karşı vücutta aktive olan başka bir yolak sempatik sinir sisteminin uyarılmasıyla adrenal medulladan epinefrin ve nörepinefrinin salgılanmasıdır. Sempatik sinir sisteminin çeşitli düzeylerde immün sistemi regüle ettiği bilinmektedir. Ayrıca stres sinir liflerinden nöropeptidlerin salınmasına neden olan "nörojenik inflamasyon" olarak adlandırılan sitokin salınımı ve dolayısıyla da immün sistem aktivitesini düzenleyen bir başka yolağı da aktifler. [15]

Melatonin büyük oranda pineal bezden salgılanan, temel görevi sirkadiyan ritim düzenlenmesi olmakla birlikte vücutta birçok biyolojik aktivitenin düzenlenmesinde yer alan endojen bir nörohormondur.[22] Bununla birlikte melatoninin antioksidan, antienflamatuvar, immünomodülatör etkileri de bulunmaktadır.[23-25] Melatonin serbest radikaller tarafından metabolize edilir ve antioksidan potansiyeli sağlayan moleküllere

dönüşür. Bunun yanında antioksidan kapasiteye sahip olan enzimleri aktifler.[23] Melatonin diyabet (DM), kardiyovasküler hastalıklar, periodontitis gibi kronik enflamatuvar hastalıklara karşı organizmanın defansif cevabını düzenleyerek etkisini göstermektedir.[26-28]

Literatür incelemesi yapıldığında melatoninin periodontitisin psikolojik stres varlığındaki periodontal sert ve yumuşak doku yıkımı üzerine etkilerini değerlendiren bir çalışma bulunmamaktadır.

Tüm bu bilgiler ışığında, bu tez çalışmasını, güçlü antioksidan, antiinflamatuar ve immün düzenleyici etkilere sahip olan melatoninin sistemik uygulamasının psikolojik stres ile ilişkili periodontal inflamatuar değişiklikler ve doku yıkımını sınırlandırabileceği hipotezi temelinde planladık. Bilgilerimize göre bu çalışma melatoninin stres ile ilişkili periodontal doku yıkımı üzerine önleyici etkilerini biyokimyasal, histolojik ve immünuhistokimyasal olarak incelemeyi amaçlayan ilk çalışma olma özelliğine sahiptir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Periodontal Hastalıklar

Periodontal hastalık, diş ve dişleri destekleyen dokuları (dişeti, periodontal ligament, alveolar kemik ve bağ dokusu) etkileyen infeksiyöz kaynaklı kronik enflamatuar bir hastalıktır.[29] Enflamasyon, periodontal hastalığın primer patolojik özelliğidir. MDP ve oral florada bulunan çeşitli spesifik patojen mikroorganizmalar enflamasyonun gelişmesinden sorumlu primer etiyolojik faktörlerdir. [30] Periodontal hastalığın oluşması için patojen mikroorganizmaların varlığı gereklidir, ancak tek başlarına yeterli değildir. Periodontal hastalığın başlaması ve ilerlemesi, bu patojenlere karşı konağın oluşturduğu immün yanıtın şiddetine bağlıdır.[31] İnsanlarda bulunan en yaygın periodontal hastalıklar gingivitis ve periodontitistir.[32] Gingivitis, dişler üzerinde dental biyofilm birikimi ile başlayan, dişetinde kızarıklığın, sondlama sonrasında veya spontan kanamanın, dişeti oluğu sıvısında artışın, dişetinde ödemin olduğu, radyografik kemik kaybının olmadığı periodontal bir hastalıktır. Sondlamada kanama ve dişeti oluğu sıvısı artışı hastalığın en erken iki bulgusudur.[33] İlk olarak MDP'ye cevap olarak başlayan gingivitis oral hijyen işlemleri uygulandığında geri dönüşümü olan iltihabi bir süreçtir. Ancak tedavi edilmediği süreçte kronik dişeti iltihabı geri dönüşümsüz periodontitis aşamasına geçebilir.[34] Periodontitis, dişi destekleyen periodontal ataşmanın yıkımı ile karakterize polimikrobiyal, multifaktöriyel, kronik inflamatuar bir hastalıktır. [35] MDP, periodontal hastalık gelişimi için birincil etiyolojik ajan olarak kabul edilmekle birlikte, periodontitisin şiddeti, paterni ve ilerlemesi, sadece mevcut olan plak miktarı ile açıklanamaz. Periodontopatojenlere karşı inflamatuar sitokinlerin üretimi ile karakterize konak immün-inflamatuar yanıt çevresel ve kazanılmış risk faktörlerinden etkilenerek bireylerin periodontal hastalık duyarlılığını ve hastalık semptomlarını büyük ölçüde belirler.[36]

2.1.1.Periodontal ve Peri-İmplant Hastalıkların Sınıflandırılması

Periodontal ve peri-implant hastalıklar ve durumlar için sınıflandırma ihtiyacı, klinisyenlerin hastalıkları doğru şekilde teşhis ve tedavi etmeleri, ayrıca hekimlerin periodontal ve peri-implant hastalık ve durumların etiyoloji, patogenez, tarih ve tedavilerini araştırması için gereklidir.

Avrupa Periodontoloji birliği ve Amerikan Periodontoloji Akademisi'nin ortak calışmasıyla 1999 yılı Periodontal Hastalık Sınıflaması değiştirilmiş ve 'Periodontal ve Periimplant Hastalıklar ve Durumların Sınıflaması 2017' başlığı ile yeni bir sınıflama tanımlanmıştır.

2017 yılında yapılan son sınıflandırma; periodontal sağlık, gingival hastalık ve durumları, periodontitis ve periodonsiyumu etkileyen diğer durumlar olmak üzere üç ana başlık altında toplanır. Periodontitisin sınıflandırılması ise hastalığın patofizyolojisine uygun olarak 3 başlık altında incelenir. Bunlar; periodontitis (1999 yılında kabul edilen eski sınıflamadaki agresif ve kronik formlar kaldırılıp tek çatı altında toplanmıştır), nekrotizan periodontitis ve sistemik hastalıkların belirtisi olarak periodontitis şeklindedir. Ayrıca peri-implant hastalıkları ve durumları ise periimplant sağlıklı, periimplant mukozitis, periimplantitis, periimplant yumuşak ve sert dokudaki yetersizlikler olarak incelenmiştir(Tablo2.1).[37]

Tablo 2.1. Periodontal ve Peri-implant Hastalık ve Durumlarının Sınıflandırılması

<table>
<tr><th colspan="10">Periodontal ve Peri-implant Hastalık ve Durumlarının Sınıflandırılması</th></tr>
<tr><th colspan="10">Periodontal Hastalıklar ve Durumlar</th></tr>
<tr><td colspan="3">Periodontal sağlık, gingival hastalıklar ve durumlar</td><td colspan="3">Periodontitis</td><td colspan="4">Periodonsiyumu etkileyen diğer durumlar</td></tr>
<tr><td>Periodontal sağlık ve gingival sağlık</td><td>Dental biyofilmle ilişkili gingivitis</td><td>Dental biyofilmle ilişkili olmayan gingival hastalıklar</td><td>Nekrotizan periodontal hastalıklar</td><td>Periodontitis</td><td>Sistemik hastalığın bir belirtisi olarak periodontitis</td><td>Sistemik hastalıkların veya durumların periodontal destek dokuları etkilemesi</td><td>Periodontal apseler ve endodontik periodontal lezonlar</td><td>Mukogingival deformiteler ve durumlar</td><td>Travmatik oklüzal kuvvetler</td><td>Diş ve protezle ilişkili faktörler</td></tr>
<tr><th colspan="10">Peri-implant Hastalıklar ve Durumlar</th></tr>
<tr><td colspan="3">Peri-implant sağlık</td><td colspan="3">Peri-implant mukozitis</td><td colspan="2">Peri-implantitis</td><td colspan="2">Peri-implant yumuşak ve sert doku eksiklikleri</td></tr>
</table>

2.1.2. Periodontal Sağlık

Periodontal sağlık, inflamatuar periodontal hastalığın olmaması durumudur ve bu durum klinik olarak değerlendirildiğinde gingivitis veya periodontitisten kaynaklı enflamasyonun bulunmamasıdır.[38] Literatürde periodontal sağlık ile ilgili mutlak periodontal sağlık ve klinik sağlık olmak üzere 2 farklı tanımlama yapılmaktadır. Mutlak periodontal sağlık klinik ve radyografik olarak tanı parametrelerinin negatif olduğu, periodonsiyumda anatomik değişikliğin görülmediği ve histolojik olarak enflamasyonun bulunmadığı durum olarak açıklanmaktadır. Mutlak periodontal sağlık pek mümkün olmamakla birlikte, klinik sağlık terimi daha sık karşılaştığımız bir durumdur. Klinik sağlık, sondlamada kanamanın görülmediği, az sayıda lokal alanlarda diş eti enflamasyonunun bazı bulgularının görülebildiği bir durum olarak tanımlanır. Bununla birlikte klinik gingival sağlık terimi 2 alt başlığa ayrılmaktadır. Bozulmamış periodonsiyum üzerinde klinik gingival sağlık; enflamasyon bulgularının olmadığı ya da

çok az olduğu, klinik ataçman kaybı ve kemik kaybının bulunmadığı durumdur. Azalmış periodonsiyum üzerinde klinik gingival sağlık; enflamasyon bulgularının olmadığı periodontitis olmaksızın diş eti çekilmesi veya kron boyu yükseltmesi sebebiyle klinik ataçman kaybı ve kemik kaybının bulunduğu bir durumu tarif eder.[39]

2.1.3. Gingivitis

Son yapılan sınıflandırmaya göre gingival hastalıklar iki alt başlıkta incelenmektedir: dental biyofilm tarafından indüklenen gingivitis, dental biyofilm tarafından indüklenmeyen gingival hastalıklar.[40]

Dental biyofilmin neden olduğu gingivitiste, inflamatuvar lezyon periodontal ataşmana (sement, periodontal ligament ve alveolar kemik) uzanmaz. Karakteristik özellikleri, dişeti kenarında plak gözlenmesi, dişetinin belirli bölümlerinde eritem, dişeti oluğu sıvısında artış, sondalama veya spontan kanama, sulkuler sıcaklık artışı, ataşman ya da kemik kaybının olmaması ve hastalığın dişeti kenarından başlamasıdır.[41] Sondalamada kanama ve dişeti oluğu sıvısı miktarında artış gingivitisin en erken iki bulgusudur.[33] Gingivitis, oral hijyen işlemlerinin uygulanıp plağın uzaklaştırılmasıyla geri dönüşümü olan enflamatuar bir süreçtir, bu sürecin periodontitise ilerlememesi için gingivitis hastalarının plak kontrolünün sağlaması ve oral hijyen konusuna dikkat etmeleri gerekir.[42]

Dental biyofilm tarafından indüklenmeyen gingival hastalıklar, biyofilmden kaynaklanmayan ve uzaklaştırıldıktan sonra genellikle geri dönüşümü olmayan çeşitli lezyonları içermektedir. Bu lezyonlar sıklıkla sistemik bir durumun belirtileridir ve gingival dokularda sınırlı patolojik değişiklikler gösterirler. Bu lezyonların kaynağı biyofilm olmasa da gösterdikleri klinik belirtilerin derecesi çoğunlukla biyofilme bağlıdır.[43] Lezyonların etiyolojisine dayanarak; enflamatuvar ve immün durumlar, genetik / gelişimsel bozukluklar, belirli enfeksiyonlar, reaktif lezyonlar; neoplazmlar,

endokrinal bozukluklar, beslenme ve metabolik hastalıklar, travmatik lezyonlar ve gingival pigmentasyon başlıkları altında bir sınıflama yapılmıştır.[44]

2.1.4. Periodontitis

Periodontitis, diş destek dokuların enflamasyonu ile başlayan ve tedavi edilmediği takdirde hastalığın ilerlemesi ile birlikte ataşman ve kemik kaybıyla karakterize inflamatuar, multifaktoriyel, kronik bir hastalıktır.[1]

Gelişmesinden ve ilerlemesinden dental biyofilm sorumlu olmakla beraber patogenezinde konak yanıtı da önemli bir rol oynar.[45] Periodontitis çeşitli yaş gruplarında görülebilir, ancak hastalığın prevalans ve şiddeti yaşla beraber artar.[45]

Periodontitis, gingivitisin devamı olarak düşünülebilir fakat gingivitis olan tüm vakalar periodontitise ilerlemez. Periodontitis gelişimi psikolojik stres, DM, sigara kullanımı, beslenme gibi birçok sistemik ve lokal hazırlayıcı faktöre bağlı olan bir süreçtir.[46]

Amerikan Periodontoloji Akademisi ve Avrupa Periodontoloji Federasyonu' nun 2017 Dünya Çalıştayı' nda peridontitis; nekrotizan periodontitis, sistemik hastalıkların belirtisi olarak periodontitis ve 1999 sınıflamasından farklı olarak kronik ve agresif periodontitis yerine sadece periodontitis olarak 3 bölümde adlandırılmış, sadece periodontitisi ise şiddet ve tedavi kompleksliğine göre evrelere (Evre 1-4) ve çabuk ilerleme riski ve tedaviye tahmini yanıta göre aşamalara (Derece A-C) ayırmıştır.[47]

Bu yapılan son sınıflamaya göre periodontitis tanımı; komşu olmayan iki veya daha fazla dişte interdental klinik ataçman kaybı (KAK) ya da iki veya daha fazla dişte 3mm' den fazla periodontal cep ile oral ya da bukkal klinik ataçman kaybının 3mm veya daha fazla olmasıdır.[35]

Periodontitisin teşhisinde kullanılan KAK ölçümüne, periodontal olmayan nedenlerle oluşan kayıplar dahil edilmez. Bunlar, travma kaynaklı diş eti çekilmesi, servikal bölgeye uzanan diş çürükleri, üçüncü moların malpozisyonu veya ekstraksiyonu ile ilişkili olarak ikinci moların distalinde KAK varlığı, marjinal periodonsiyumdan direne olan bir endodontik lezyon, vertikal kök kırığının meydana geldiği durumlardır.[35]

Evreleme sistemi hastalığın şiddetine, boyutuna ve dağılımına ayrıca hastalığı yönetmenin kompleksliğine göre yapılır. Hastalığın şiddeti, bireyde oluşan periodontitis kaynaklı mevcut periodontal bozulmanın derecesini temsil eder ve vaka tanımlamada kilit rol oynar. Hastalığın şiddetinin belirlenmesi hastalığı yönetmenin kompleksliğini anlamada, boyut ve dağılımını belirmede ilk basamaktır. Hastalığı yönetmenin kompleksliği periodontitis için gerekli olan tedavi ihtiyacını belirlemeye ve bu tedaviden optimum sonuçlar elde etmek için ihtiyaç duyabilecek yetkinlik ve deneyim düzeyini tanımlamaya yardımcı olur. Hastalığın boyutu ve dağılımı 1999 sınıflamasında mevcut dişler içerisinde yüzdelik dilimlerle etkilenen diş sayısı olarak kullanılmıştır.[48] Yapılan son sınıflamada da tespit edilebilir periodontal bozulma ile diş sayısı ve dağılımı sınıflandırma sisteminin bir parçası olmuştur.[35]

Periodontitis evreleme sistemi hafiften şiddetliye doğru dört bölümden (I- IV) oluşur. Evre; sondalama derinliği, KAK, kemik kaybının miktarı, yüzdesi ve tipi, diş mobilitesi, açısal kemik defektlerinin varlığı ve şiddeti, furkasyon tutulumu ve periodontitise bağlı diş kaybı gibi değişkenlere bakılarak belirlenmektedir.[1, 35, 49]

Hastalığın şiddet skoru, esas olarak interdental KAK'a dayanmaktadır (eğer bu veri mevcut değilse radyografik kemik kaybı kullanılmalıdır) ancak marjinal kemik kaybı ayırıcı tanımlayıcı olarak dahil edilmektedir. Hastalığın şiddeti, prognozu en kötü dişe dayanarak belirlenmektedir. Karmaşıklık skoru, vertikal defektlerin varlığı, furkasyon

tutulumu, diş hipermobilitesi, diş malpozisyonu, diş kaybı, kret defektleri ve ciğneme işlevi kaybı gibi faktörlerin değerlendirilmesini içermektedir.[35]

Evre I Periodontitis: Hastalığın gingivitisten periodontitise ayrıldığı bir sınır evresidir. Gingivitis ve biyofilm disbiyozunun devamlılığı sonucu yanıt olarak periodontitis gelişmiştir. Bu evre ayrıca KAK'ın başlangıç aşamasını temsil eder. Evre I periodontitisin klinik özellikleri; İnterdental klinik ataşman kaybı en fazla 1-2 mm'dir. Radyografik kemik kaybı (genellikle horizontal) koronal üçlüde %15'i geçmez. Periodontitis kaynaklı diş kaybı bulunmamaktadır. Sondlama derinliği 4mm ya da daha azdır.[35] Periodontal sondlama, erken KAK'ı belirlemede yetersiz kalabilmektedir; tükürük biyobelirteçleri ve/veya yeni görüntüleme teknolojileri kullanımı evre I periodontitisin erken saptanmasını sağlayabilir. Hastalığın bu evredeki tedavisi için subgingival alandan bakteriyel yığılmanın ve diş taşlarının kaldırılması takiben etkili bir plak kontrolü sağlanmalıdır (Tablo 2.2).[35, 50]

Evre II Periodontitis: Periodontitisin diş destek dokularında yaptığı hasarı tanımlayan yerleşik safhası yapılan son sınıflamadaki evre II periodontitisi temsil eder. Bu evrenin klinik bulguları; interdental KAK en fazla 3-4 mm'dir ve radyografik kemik kaybı (genellikle horizontal) koronal üçlüde %15-33 arasındadır. Periodontitis kaynaklı diş kaybı gözlenmez. Sondlama derinliği en fazla 5mm'dir. Hastalık sürecinin bu aşamasında, etkili bir plak kontrolü ve standart cerrahisiz tedavi prensiplerinin uygulanması ile hastalığın ilerlemesinin durması beklenir fakat Evre II hastanın standart tedavi protokollerine cevabının dikkatle değerlendirilmesi ve tedavi sonrası takip önemlidir, hastalığın derecesi ve verdiği tedavi yanıtına göre daha ileri tedavi protokolleri uygulanabilir (Tablo 2.2).[35]

Evre III Periodontitis: Diş destek dokularının ileri derecede yıkımıyla karakterize bu evrede, belirgin ataçman kayıpları mevcuttur. Kendisinden önceki evrelerin aksine periodontitis kaynaklı diş kayıpları izlenir ve ileri tedavi protokolleri uygulanmadığında kayıpların sayısında artış görülebilir. Evrenin klinik özellikleri; KAK 5 mm veya daha fazladır. Sondlama derinliği 6 mm veya daha fazla, kemik kaybı ise 3 mm veya daha fazladır. Kökün orta kısmına veya apikal üçlüsüne uzanan derin kemik içi defektler mevcuttur. Furkasyon tutulumu (sınıf II ve III) vardır. Periodontal kaynaklı en fazla 4 olacak şekilde diş kaybı öyküsü ve lokalize kret defektlerinin bulunması ile komplike hale gelen derin periodontal lezyonların varlığı ile karakterizedir. Diş kaybı olmasına rağmen çiğneme fonksiyonu korunmuştur (Tablo 2.2).[35]

Evre IV Periodontitis: Bu evrede periodontitis kaynaklı diş destek dokularında meydana gelen yıkımın uygun tedavi ve protokoller uygulanmadığında dentisyon kaybına dönüşmesi söz konusudur. Önemli sayıda diş kaybının gözlendiği evre çiğneme fonksiyonunun kaybıyla sonuçlanabilir. Dişlerde hipermobilite ve sekonder okluzal travma sıklıkla gözlenir. Periodontitisin bu evresinde vaka yönetimindeki asıl amaç çiğnemenin stabilizasyonu ve restorasyonudur. Evrenin klinik özellikleri; İnterdental klinik ataşman kaybı 5 mm veya daha fazladır ve radyografik kemik kaybı kökün orta veya apikal üçlüsüne kadar uzanmaktadır. Periodontitis kaynaklı en az 5 diş kaybı vardır. Hastalarda çiğneme disfonksiyonu mevcuttur ve dişlerde sekonder okluzal tramvaya bağlı diş mobilitesi söz konusudur (Tablo 2.2).[35]

Tablo 2.2.Periodontitis Evreleri

Periodontitis Evre		Evre 1	Evre II	Evre III	Evre IV
Hastalık Şiddeti	En Fazla Kayıp Bölgesinde İnterdental Klinik Ataçman Kaybı	1-2 mm	3-4 mm	≥5 mm	≥5 mm
	Radyografik Kemik Kaybı	Koronal 1/3 <%15	Koronal 1/3 %15-%33	Kök Yüzeyinin orta/apikal 1/3'üne uzanan	Kök Yüzeyinin orta/apikal 1/3'üne uzanan
	Diş Kaybı	Periodontitise Bağlı Diş Kaybı Yok		Periodontitise Bağlı Diş Kaybı ≤4	Periodontitise Bağlı Diş Kaybı ≥5
Kompleksite	Lokal	Maksimum Sondlama Derinliği ≤4 Genellikle Horizontal Kemik Kaybı	Maksimum Sondlama Derinliği ≤5 Genellikle Horizontal Kemik Kaybı	Evre II'ye ek olarak: Sondlama Derinliği ≥ 6 mm Vertikal Kemik Kaybı ≥ 3 mm Sınıf lI veya Sınıf III Furkasyon Problemi Orta Derecede Kret Defekti	Evre III'e ek olarak: Kompleks rehabilitasyon gereken durumlar; Çiğneme Disfonksiyonu Sekonder Okluzal travma (diş mobilite derecesi ≥2 Şiddetli Kret Defekti Kapanış bozukluğu Dişlerde Sürüklenme(Drifting) ve Alevlenme (Flaring) 20'den az diş
Kapsam ve Dağılım	Tanımlayıcı Olarak Eklenecek	Her Bir Evre İçin Dağılımın, Lokalize (<%30), Generalize veya Molar / İnsizor Karakterde Olduğu Belitilir			

Derecelendirme sistemindeki esas amaç periodontitisin geçen zamanla birlikte ne şekilde ilerlediğini saptamaktır. A, B, C alt başlıklara ayrılan sistem hastalığın ilerleme hızını ve yapılan standart tedaviye yanıtı değerlendirerek gelecek riski belirler. Tedavinin olası kötü sonuçlarının analizi ve aynı zamanda periodontitis ile sistemik sağlık arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi de dahil olmak üzere biyolojik özellikler hakkında

daha kapsamlı bilgi içerir.[35] Bu derecelendirme sistemi hasta ile ilgili risk faktörlerinin sınıflamaya dahil edilmesine imkan verir. Hastada hastalık ilerleyişini arttıran veya tedaviye yanıtı azaltan risk faktörleri (sigara, diyabet) varsa, risk faktorüne ait bilgiler hastalığın gelecek dönemdeki prognozunu tahmin etmek icin kullanılabilmektedir. Bu nedenle, risk faktörü varlığında derece skoru yüksek bir değere taşınmalıdır.[35]

Derece A: Periodontitisin ilerleme hızı yavaştır. 5 yıldan fazla sürede klinik ataşman kaybı ve radyografik kemik kaybı olmamalıdır. Kemik kaybı yüzdesinin yaşa oranı 0.25'ten azdır. Fazla miktarda biyofilm bulunmasına rağmen düşük seviyede yıkım söz konusudur. Hastalarda DM ve sigara kullanım öyküsü yoktur. Yüksek duyarlılıklı C reaktif protein (hsCRP) seviyesi 1 mg/L'den azdır (Tablo 2.3).[35]

Derece B: Periodontitisin, ilerleme hızı orta derecedir. Uzun dönem verilere göre, 5 yıldan fazla sürede 2 mm'den az klinik ataşman kaybı veya radyografik kemik kaybı görülmelidir. Kemik kaybı yüzdesinin yaşa oranı 0.25-1.0 arasındadır. Biyofilm birikimi ile yıkım orantılıdır. Bireylerin günlük sigara kulanımı 10 adedin altındadır. DM hastalarında hemoglobin A1c (HbA1c) %7'den düşüktür. Yüksek duyarlılıklı hsCRP seviyesi 1-3mg/L arasındadır (Tablo 2.3).[35]

Derece C: Periodontitis, hızlı ilerlemektedir. Uzun dönem verilere göre, 5 yıldan fazla sürede klinik ataşman kaybı ve radyografik kemik kaybı 2 mm ve üzerindedir. Kemik kaybı yüzdesinin yaşa oranı 1'den fazladır. Biyofilm birikimine oranla yıkım beklenenden fazladır. Hızlı ilerleyen kemik yıkımı mevcuttur. Bireylerin günlük sigara kullanımı 10 adedin üzerindedir. DM hastalarında HbA1c %7'de fazladır. Yüksek duyarlılıklı hsCRP seviyesi 3 mg/L'den fazladır (Tablo 2.3).[35]

Tablo 2.3. Periodontitisin derecelendirilmesi

Periodontitis Derecesi			Derece A	Derece B	Derece C
Primer Kriter	İlerlemenin Direkt Kanıtları	Longitudinal Veriler (Radyografik Kemik Kaybı veya KAK)	5 yılın üzerinde kayıp bulgusu yok	5 yılın üzerinde < 2 mm	5 yılın üzerinde ≥ 2 mm
	İlerlemenin İndirekt Kanıtları	% Kemik Kaybı / Yaş	<0.25	0.25- 1.0	> 1.0
		Vaka Fenotipi	Biyofilm miktarına göre dokularda yıkım düşük	Biyofilm miktarıyla dokularda yıkım orantılı	Biyofilm miktarına göre dokularda yıkım fazla
Derece Belirleyicisi	Risk Faktörleri	Sigara	Sigara Kullanmayan	Sigara <10/ gün	Sigara ≥ 10/ gün
		Diabet	Normoglisemik/ Diabet Teşhisi konmamış	HgAlc < %7 Diabetli Bireyler	HgAlc ≥ %7 Diabetli Bireyler
Periodontitisin Sistemik Etki Riski	İnflamatuar Yük	Yüksek Duyarlı C Reaktif Protein (hsCRP)	< 1 mg/L	1-3 mg/L	> 3 mg/L
Biyobelirteçler	KAK/Kemik Kaybı Göstergeleri	Tükürük, DOS, Serum	?	?	?

2.1.5.1. Periodontitisin Patogenezi

Periodontal hastalık patogenezini açıklamaya yönelik olarak yapılan çalışmalara göre periodontal hastalık ilerleyişi etkileyen faktörler; MDP, immün yanıttaki değişiklikler veya bireyin periodontitise olan yatkınlığı, periodontopatojenlerin varlığı, hastalık oluşturabilme yetenekleri (virulansı) ve periodontal cep içindeki yararlı türlere dominant olmasıdır.[51]

MDP periodontal hastalık etyolojisinde birincil faktördür. MDP üç aşamada meydana gelir. İlk olarak dişler fırçalandıktan az bir süre sonra diş eti oluğu sıvısı (DOS) ve tükürükten gelen glikoproteinler pelikıl adı verilen diş yüzeyini örten yapıyı meydana getirir. Daha sonra diş yüzeyini kaplayan pelikılın üstüne birkaç saat içinde primer bakteri akümülasyonu başlar. Actinomyces viscosus ve Streptococcus sanguis gibi gram

pozitif fakültatif bakteriler yüzey kısımlarında yer alan reseptörlerle (adhesin), pelikıldaki proteinlere bağlanır. Son olarak gram-negatif bakterilerin özel kimyasal bağlarla plak yüzeyindeki gram-pozitif bakterilere bağlanması sonucunda sekonder bakteri akümülasyonu oluşur. Bu oluşumun erken döneminde Fusobacterium nucleatum, Prevotella loesheii, Prevotella intermedia, Capnocytophaga ochracea, geç dönemde Porphyromonas gingivalis ve Treponema denticola gibi periodontopatojenlerin yığılımı gözlenir. Periodontal sağlıklı mikroflorada gram-pozitif aerob bakteriler dominanttır. MDP'de meydana gelen olgunlaşma ile mikroflorada gram-negatif anaerob bakteriler üstünlük kurar ve diş etinde enflamasyonun klinik belirtileri görülmeye başlanır. İlk olarak gingivitis meydana gelir. Periodontitise yatkın bireylerde; gingivitis başlangıcındaki immün yanıt, nötrofil ve antikor aktivasyonu yeterli koruma sağlayamadığından veya MDP ortamdan uzaklaştırılamadığından bakteriler ve ürünleri daha derin dokulara penetre olur ve subgingival plak oluşur. Periodontitiste görülen mikroflora, gram-negatif anaerobik basiller, koklar ve anaerobik spiroketlerden oluşur.[52] Tüm bu süreç MDP'nin periodontitis açısından önemini gösterse de güncel bulgular, MDP'nin periodontal hastalığın başlaması ve ilerlemesinde yeterli olmadığını göstermiştir. Periodontal hastalıkla ilişkili sert ve yumuşak doku yıkımının major komponenti, MDP'ye karşı konak immun-inflamatuar yanıtının aktivasyonudur. MDP'ye cevap olarak konak tarafından oluşturan enzimler, sitokinler ve diğer medyatörlerin etkisi ile periodontitits ortaya çıkar, ilerler ve doku yıkımı meydana gelir[53].

Periodontopatojenlerin dolaylı ya da doğrudan sebep olduğu farklı doku yıkım mekanizmaları mevcuttur. Periodontopatojenler direkt proteolitik enzimleri ile konak hücrelerinin etkisi olmaksızın doku yıkımı yapabilir ya da kendi virülans faktörleri olarak bilinen toksin, enzim ve lipopolisakkarit (LPS)'lerini kullanarak, yıkım enzimleri üreten konak hücrelerini uyarabilir, immün yanıtı stimüle eden konak hücrelerinden olan

lenfosit, makrofajlar ve polimorf nüveli lökositlerden (PMNL) bir veya daha çok yıkım yolunu aktive eden sitokinlerin dolayısıyla da matriksmetalloproteinazların (MMP) salınımına neden olabilir[54, 55]

Periodontal doku yıkımında dolaylı ya da doğrudan mekanizmaların her ikisinin de rolü olsa da doku yıkımının çoğunluğu konağın inflamatuar cevabından kaynaklanır. Patojenler önemlidir, çünkü enflamasyonu başlatıp daimi hale getirirler fakat doku yıkımının direk olarak çok az bölümünden sorumludurlar.[56]

Periodontitisin gelişimine sebep olan mikrobiyal enfeksiyonu engellemek için periodonsiyumda bulunan birçok faktör birlikte çalışmaktadır. Epitelin bütünlüğü (gingival, sulkuler, birleşim) bariyer oluşturarak bakterilerin dokuya invazyonuna engel olmaktadır. Diş eti oluğu sıvısı periodontal cebin ve sulkusun düzenli olarak yıkanmasını sağlamaktadır. Ayrıca DOS içerdiği kompleman proteinleri ve spesifik antikorlar ile subgingival plak bakterilerine karşı antimikrobiyal etki göstermektedir. Salya ürünleri ağız boşluğunun düzenli yıkanmasını sağlarken, bakterisid etki salya içeriğindeki aglutinin ve antikorlar ile gerçekleşir. Epitel ve ekstraselüler matriksteki hızlı deskuamasyon döngüsü, hasar görmüş dokuların hızlıca yenilenmesini sağlar.[56, 57]

2.1.5.1.1. Mikroorganizma-Konak Etkileşiminde Yer Alan İmmünolojik Faktörler ve Mediyatörler

Mikrobiyal antijenler ve virulans faktörleri konakta hızlı bir iltihabi ve immün cevabın oluşmasına neden olur. Konak, mikrobiyal ürünlere karşı sitokinler, kininler, MMP'ler üreterek ve kompleman sistemi aktive ederek cevap verir. Bu iltihabi mediyatörler ise, periodontal dokuların yıkımında rol oynamaktadır.[58]

Enfeksiyöz veya enflamatuar uyarana karşı doğal immün ve kazanılmış immün cevap olmak üzere iki cevap oluşur. Doğal immün yanıt doğuştan itibaren mevcuttur,

enfeksiyonlara karşılık ilk savunma hattını oluşturur. Bu tip savunma kalıtsal olarak gerçekleşir hızlıdır ancak patojene özel değildir ve daha önce karşılaşılan patojenler sonucunda gelişmez, nonspesifiktir. Doğal immünite, ağız epitelinin fiziksel ve biyokimyasal koruyucu özelliklerini, enflamatuar cevabın damarsal ve hücresel olaylarını kapsamaktadır. Enfeksiyon ve enflamasyona karşı ani koruma sağlayan koruyucu bu cevap, mikroorganizmaların ve yabancı yapıların makrofajlar ve nötrofiller tarafından fagositozu ve sindirimi ile karakterizedir.[59, 60] Doğal bağışıklık sistemi, kompleman sisteminin aktivasyonunda bağışıklık sistemi hücrelerinin toplanmasında, yabancı maddelerin tanınmasında ve uzaklaştırılmasında, kazanılmış immünitenin aktivasyonunda rol oynar.[61]

Kompleman sistem aktivasyonu enflamasyonun başlaması ile başlar. Kompleman sistemi henüz kazanılmış immün cevap devreye girmemişken alternatif yoldan ya da klasik yoldan aktive olur. Bu aktivasyon mikrobiyal yapısal ürünlere cevap olarak gerçekleşir. Kompleman sistemi aktive olduğunda; C3a, C4a, C5a (anaflatoksinler) aracılığıyla mast ve lökosit hücrelerinden histamin salgılanarak vazodilatasyona sebep olurlar, vazodilatasyon sonucu damarsal geçirgenlik artar ve savunma sistemine ait hücreler ve mediyatörler kandan dokuya geçiş yapar. Kompleman sistem lökosit aktivasyonu, adezyonu, kemotaksisine C5a aracılığıyla yardım eder, fagositozda opsonin olarak görev yapan C3b 'yi üretir. Ayrıca membran atak kompleksi (MAC) kullanarak mikroorganizmların membranlarında gedikler açar ve doğal immüniteye katkıda bulunur.[62]

Fagositoz özelliğine sahip olan makrofaj ve nötrofil bakterilerin yüzeylerinde yer alan molekülleri tanırlar ve reseptörleriyle bu moleküllere bağlanırlar.[63] Bakterilerin tanınması ve konaktan ayırt edilmesinde tanıyıcı reseptör olarak adlandırılan Toll-like reseptörleri (TLR) görev alır.[64] TLR'nin aktive olması hücre içi sinyalizasyonun artarak

transkripsiyon elemanlarının aktiflenmesini sağlar. Bu durumun sonucu olarak inflamatuar sitokin sentezi ve salınımı, lökosit migrasyonu ve kemik yıkımı hücrelerinin yapımında artış gözlenir .[65] TLR sistemi doğal immün sistemin enfeksiyonlara verdiği ilk yanıtını yönetirken, adaptif immün sistem için de ikincil uyarıyı sağlamaktadır.[66]

Periodontopatojenlere karşı savunmada kompleman sistemi yetersiz kalırsa, doğal immün cevabın hücreleri olan nötrofiller görev almaya başlar. Nötrofiller periodontal enflamasyonun akut safhasında endotelyal boşluklardan göç ederek konak cevabının ilk savunma hattını oluşturular. Diş eti cebinde yığılan nötrofiller patojen kaynağı olan subgingival plak ile periodontal dokular arasında bir bariyer olarak görev yapmaya çalışır. Nötrofillere rağmen enfeksiyonun devam etmesi savunmanın ikinci hattını oluşturan fagositoz özelliğine sahip monositlerin aktive olmasına sebep olur.[67] Bağ dokusuna gelen aktif monositler başka bir fagositer hücre olan makrofajlara dönüşürler.

Makrofajlar sağlıklı periodontal dokularda eser miktarlarda bulunur, ancak bakteriyel faktörler ile karşılaştıklarında antijene bağımlı olmadan aktive olurlar. Periodontal hastalığın ilerlemesinde önemli bir role sahip olan makrofaj, konağın verdiği cevabı akut inflamasyondan immün sistem elemanlarının bulunduğu kronik bir patolojiye geliştirir.[68] Bakterilerin sahip olduğu LPS'ler makrofajların aktiflenmesine neden olur. Makrofajların aktif hale geçmesiyle birtakım sitokinler (TNF-α, TGF-β, IL-1, IL-6, IL-12, IL-10, IFN- γ vb.),yüzey resepetörleri, prostoglandin E2 (PGE2) ve MMP üretilir. Antijene spesifik yanıtın başlaması bu sitokinlerin aracılığıyla olur. Sonuç olarak periodontopatojenler özgü hedef haline gelir ve konak enflamatuvar cevabı şiddetlenir.[69]

Doğal immün yanıt ve kazanılmış immün yanıt arasındaki temel fark; kazanılmış immün yanıtın periodontopatojenleri birbirinden ayırt edebilmesidir. Patojene özgü bir konak savunması kazanılmış immün yanıtı daha etkili kılar. Kazanılmış immün sistem

antijenleri tanımamın yanı sıra özgü patojenlerin uzaklaştırılması amacıyla bir savunma mekanizmasını geliştirir ve tekrarlanan karşılaşmalarda antijen işaretlerini hatırlar. Bu sistemin temel hücreleri T ve B lenfositlerdir. Lenfositlerin dokudaki proliferasyonu akut enflamatuar yanıttan hemen sonra gelişir. Antijenle tekrar karşılaşmalarında lenfositler CD4+ ve CD8+ T hücrelerini oluştururlar. Bu dönüşümün temel sebebi daha hızlı ve etkili savunma oluşturmaktır.[70] Oluşan CD+4 T hücreleri de iki ayrı yardımcı yardımcı hücre grubuna farklılaşır. Bu hücre grubunun ilk elemanı yardımcı T hücre 1 (Th1)'dir. Ana görevi hücresel immün cevabın regüle edilmesidir, bunun yanı sıra B lenfositleri ve plazma hücrelerini de baskılar. Hücre grubunun ikincil elemanları yardımcı T hücre 2 (Th2)'dir. Th2'ler hümoral immünite ile ilişkilidir. Enflamasyonun baskılanmasında görev alır. Ana görevi B lenfosit hücrelerinin indüklenmesidir, bunun yanı sıra T hücrelerinden gelen yanıtı da baskılar ve patojenlerin eliminasyonundan sorumludur. T ve B lenfositler doğal öldürücü hücrelerin oluşmasını stimüle ederek ve makrofajları destekleyerek savunma mekanizmalarına katkıda bulunur. [70, 71]

B lenfosit hücreleri ise plazma hücrelerine farklılaşır, diş eti oluğu veya cep duvarında biriken plazma hücrelerinden antikor sentezlenir. Üretilen patojene özgü antikorlar bakteri fagositozunda kullanılır, bu işleviyle plazma hücreleri kompleman sisteme yardımcı olur. Bunların yanında B lenfositler doku yıkımında görevli olan proenflamatuar sitokinlerin üretildiği yerdir.[56]

Periodopatojenlere verilecek immün yanıtın kontrolü sitokin ve kemokin sinyalleriyle sağlanır. Sitokinlerin üretimi enflamasyonun akut dönemi ve kronik fazın başlangıcına kadar fibroblastlar, epitel kaynaklı hücreler ve fagositik hücreler tarafından sağlanır. Enflamasyon ilerleyip yerleşmiş ve ilerlemiş lezyona dönüştüğünde sitokin üretme görevini lenfositler üstlenir.[72] Proenflamatuvar sitokinlerin salınımı bir dizi genetik düzenleme ile sağlanmaktadır. NF-κB'nin transkripsiyonu bu genetik

düzenlemenin ilk adımıdır.[73] Hücresel düzeyde meydana gelen enflamasyonun başlamasında NF-κB kilit bir öneme sahiptir. Konağın verdiği immün cevap birçok gen ekspresyonuna sebep olur, bu gen değişikliklerinin koordinasyonu NF-κB tarafından sağlanır.[74]

Periodontal hastalıklarda patojen kaynaklı meydana gelen enflamatuar süreç konak yanıtını uyarır. Fizyolojik enflamatuar sürecin parçası olan konak kaynaklı hücreler, mediyatörler ve periodontal dokular arasındaki bağlantı belirli bir düzende işlemektedir. Ancak periodontal hastalığa yatkın kişilerde bozulmuş immün yanıt ve enflamasyon dengesi hastalığı kronik sürece ilerletip doku hasarına sebep olmaktadır. Periodontal hastalıkların tedavi süreçlerinin belirlenmesinde meydana gelen doku hasar mekanizmalarının aydınlatılması büyük önem taşımaktadır.[65]

2.1.5.1.2. Periodontal Hastalıkta Doku Yıkım Mekanizması

Periodontal hastalıklarda meydana gelen doku yıkımı aktif ve pasif dönemler olarak birbirini takip eder. Aktif olan dönemlerde hızlı bir yıkım izlenirken, pasif dönemler uzun süren doku yıkımının görülmediği dönemlerdir. Klinik olarak peridontal doku yıkımı; birleşim epitelinin apikele göçünü takip eden alveolar kemik ve periodontal ligamentin yıkımıyla tanımlanabilir.[75, 76]

Periodontal patojenler amonyak (NH_3), hidrojen sülfür (HS), kısa zincirli yağ asitleri, lökosit aktive edici peptitler ve LPS'ler gibi metabolik artıklarıyla doğrudan doku yıkımına sebep olabilse de periodontal hastalıkta doku yıkımının çoğu, periodontopatojenlerin başlattığı konağa ait yıkıcı ve koruyucu mekanizmalar arasındaki balansın bozulmasından kaynaklanmaktadır.[77]

Periodontal hastalığın devam etmesiyle oluşan konak cevabı; reaktif oksijen türleri (ROT), sitokinler, MMP'ler, Growth faktörler ve daha birçok enflamasyonu düzenleyici

mediyatörü bünyesinde barındırırır. [78] Kollajen, periodontal hastalık sürecinde yapım, yıkım, onarım, yeniden şekillenme gibi birçok değişime uğrayabilir. Gingivitisin başlangıcında kollajen fibriller enflamatuvar hücrelerin daha iyi penetre olabilmeleri için yıkıma uğrartılırlar. Daha sonra hastalığın devamı ve periodontitise ilerlemesiyle alveolar kemik ve periodontal liflerde yıkım devam eder.[79]

Nötrofiller konak cevabının başlangıcında yer alan hücrelerdir, ürettiği plazmin, ROT, katepsin G, kollagenaz ile fibroblastlar, keratinositler ve vasküler hücreler gibi birçok hücrede yıkıma sebep olur. Nötrofiller bunun yanı sıra özellikle Tip 1 kollagenin yıkımına sebep olan predominant MMP (MMP-8, MMP-9) üretiminde görev alırlar.[80, 81]

Makrofajlar patojenlere karşı ürettikleri sitokinler (IL-1, TNF- α) ile konak cevabını güçlendirerek doku yıkımını uyarırlar. Makrofajlarda bulunan PGE_2 osteoklastları stimüle ederek kemik yıkımında rol oynar. PGE_2'yi IL-1ß, TNF-α ve paratiroid hormon uyarısı stimüle eder. Makrofajlar doku yıkımını yukarıda söz edilen sitokinler aracılığıyla doğrudan uyarması yanı sıra fibroblast benzeri hücrelerden MMP üretimini arttırarak dolaylı olarak da tetikleyebilmektedir. [82]

MMP'ler periodontitis esnasında meydana gelen doku yıkımından sorumlu proteinazların en önemlisidir. MMP salınımı birçok sitokin (IL-1ß, TNF-α, PGE2) ve bakteriyel metabolite bağlı olarak gerçekleşir. MMP ve kontrolünü sağlayan inhibitörler (TIMP) arasındaki denge enflamasyon ile bozulduğunda ekstraselüler matriks proteinlerinde bozulma, hücresel membran proteinlerinde yıkım ve alveolar kemik kaybı meydana gelir.[83]

Periodontal hastalığın önemli belirteçlerinden biri alveolar kemik kaybıdır. Meydana gelen kaybın nasıl oluştuğu periodontitisin tedavisinin anlaşılması açısından oldukça önemlidir. İmmün sistemin, kemik yapım ve yıkım süreçleriyle olan bağlantısı

‘osteoimmünoloji ’ başlığı altında incelenmektedir. Yakın zamanda ortaya çıkan bu kavram periodontal hastalığın patogenezi açısında oldukça önemlidir. Periodontitiste görülen alveolar kemik kaybı sürecinin anlamlandırılmasında özellikle tümör nekroz faktör (TNF) reseptör ailesinin üç üyesi ön plana çıkmaktadır; NF-κβ’nın reseptör aktivatörü RANK, ligandı RANKL ve RANKL’ı inhibe eden OPG’dir.[84, 85]

Osteoblastlar henüz farklılaşmamış mezenkimal hücrelerden köken alırlar. Kemik dokunun olgunlaşmasından önceki organik yapının üretilmesinden sorumlu olan osteoblastlar, ayrıca kemik dokunun olgunlaşması için yerleşen inorganik moleküllerin de kontrolünü sağlar. Dengede olan bir kemik yapım ve yıkım sürecinde RANKL osteoblastlar tarafından üretilir.

Osteoklastlar monosit ve monosit benzeri hücre kaynaklı çok çekirdekli fagositik hücrelerdir. Kemiğin yapımı esnasında kompakt kısmının iç yüzeyinde, yıkım esnasında ise howship lakünalarında yer alır. Osteoklastlar kemiğin yıkımı için gerekli olan asidik pH’yı ve enzimleri oluştururlar. NF-κB’nin reseptör aktivatörü (RANK) osteoklast hücreleri üzerinde yer alır. Osteoklast oluşumu, osteoblastlar tarafından oluşturulan makrofaj koloni stimüle edici faktör ligandı (M-CSF)’nin monosit üzerindeki ilgili reseptöre bağlanmasıyla gerçekleşir.[86]

Denge halinde bulunan kemik metobolizmasında osteoblastlar tarafından üretilen RANKL, periodontal hastalık sürecinde Th1 ve Th17 hücrelerini içeren immün savunma hücrelerinde de üretilir. RANKL’ın henüz olgulaşmamış osteoklast hücreleri üzerinde bulunan RANK reseptörüne yerleşmesi ve NF-κB'nin stimüle olması olgun osteoklastın oluşmasını sağlar, bununla birlikte alveolar kemik yıkımı başlamış olur.[87, 88]

Osteoprotegerinin kemik yapım yıkım metabolizmasındaki görevi ise olgun osteoklast hücrelerinin oluşmasını engellemek amacıyla RANKL’ın RANK reseptörüne

bağlanmasını engellemektir. Osteoblastlar tarafından salgılanan OPG, RANK reseptörüne bağlanma açısından RANKL'a göre yüksek afiniteye sahiptir. OPG'nin bu özelliği kemik yıkım sürecini engellemektedir.[88]

Periodontitis esnasında oluşan enflamatuar yanıt, OPG yapımını azaltan, RANKL yapımını arttıran IL-1β,-6, -11,-17 ve TNF-α gibi proenflamatuvar sitokinleri içerir. Bu sitokinler kemik metabolizmasındaki dengeyi osteoklastogenezis lehine bozar, ancak IL-3 ve IFN-γ gibi antienflamatuvar sitokinler OPG'yi arttırıp RANKL üretimini azaltır.[89]

Periodontitiste RANKL/ OPG oranının belirgin bir şekilde etkilendiğini gösteren klinik[90, 91] ve deneysel [92] çalışmaların çok büyük bir kısmında periodontitisin bu orandaki belirgin artış ile ilişkili olduğu açıkça gösterilmiştir. [93]

2.1.5.1.3.Sitokinler

Sitokinler doğal ve kazanılmış bağışıklıkta, inflamasyonda, hematopoezde görevi bulunan düşük molekül ağırlığına sahip çözünebilir proteinlerdir.[94] Sitokinlerin, hücrelerin proliferasyonu, büyümesi, farklılaşması, enflamatuvar cevabın başlaması, düzenlenmesi, şiddet ve süresinin belirlenmesi, dokuların tamir ve rejenarasyonu gibi birçok önemli işlevi bulunur.[54] Sitokinler başta makrofaj ve T lenfosit olmak üzere immün sistem hücrelerinden ve dokularda bulunan farklı hücre çeşitlerinden üretilebilir.[95] Sitokinler etkiledikleri hücreler bakımından üçe ayrılır; çözünebilir yapıda bulanan sitokin salgılandığı hücreyi etkileyerek otokrin, yakınındaki hücreleri etkileyerek parakrin, uzakta bulunan hücreleri etkileyerek endokrin etkiye sahiptir. [96]

İnflamasyonun tetiklenmesi, devam etmesi ile bağlantılı olan sitokin grubuna proinflamatuvar sitokinler denir. IL-1α, IL-1β, IL-6, ve TNF-α gibi proinflamatuvar sitokinlerin etkileri sonucu periodontitisin önemli belirteci olan alveolar kemik kaybı meydana gelir. Proinflamatuvar sitokinlere göre zıt etki eden ve periodontal dokulardaki

inflamatuvar sürecin ilerlemesine engel olan sitokinlere ise antiinflamatuvar sitokinler (IL-4,IL-10,IL-13 TGF-β) denir.[77, 95]

Periodontitisde meydana gelen enflamasyonu arttıran ya da azaltan birçok sitokin bulunsada çalışmanın içinde yer alan IL-1 ve IL-10 sitokinleri ayrıca incelenmiştir.

2.1.5.1.3.1.İnterlökin 1 (IL-1)

IL-1 gen ailesi temel olarak 3 farklı üyeden ; IL- lα, IL -1β ve bunların reseptör antagonistleri olan IL-1Rα 'dan oluşmaktadır. IL-lα ve IL-lβ agonist etkiye sahipken, IL-1Rα ise bu sitokinlere özgü olan reseptöre bağlanarak antagonist çalışır. [97] İnterlökin 1'in üretimi uyarılmalarına (lipopolisakkarit, endotoksin vb. etkisiyle) göre birçok farklı hücreden gerçekleşebilir. Temelde monosit, makrofaj, lenfosit gibi savunma hücrelerinden üretilse de fibroblast, epitel, vasküler ve düz kas gibi hücrelerde de üretilebilirler.[98]

IL-1 temel bir proinflamatuar sitokin olup düşük konsantrasyonlarda endotel hücrelerinde adezyonu regüle eden (selektin vb.) yüzey moleküllerin ekspresyonunu arttırarak PMNL'lerin transendotelyal göçünü kolaylaştırır. Başlangıç inflamatuar cevapta PMNL için kimyasal bir uyarıcı olan olan IL-1, lenfosit ve antijen sunucu hücreleri de doğrudan veya dolaylı uyarabilir.[99] IL-1 ayrıca enflamasyonun akut döneminde görevli proteinlerin sentezinin stimüle edilmesi, diğer sitokinlerin uyarılması, kollajenin yapım ve yıkımının başlatılmasında görev alır.[99] IL-1 'in enflamasyon sırasında MMP'leri ve osteoklastları uyarması kemik ve bağ dokusunda yıkım sürecinin başlamasına sebep olmaktadır. [100] IL-1'in alt grupları alveolar kemik yıkımı açısından karşılaştırıldığında IL-1β , IL-1α'ya göre oransal olarak oldukça üstündür. Ancak bu iki sitokin periodontitisli bireylerde, sağlıklı olanlara göre periodontal dokularda daha fazla bulunur.[101]

Periodontitis ve IL-1β ile ilgili yapılan çalışmalar; ratlarda deneysel olarak oluşturulan periodontitis modellerinde, rekombinant insan IL-1β'sı uygulanan gruplarda 14.gün sonunda alveolar kemik kaybının uygulanmayan gruplara daha fazla olduğu gösterilmiştir.[102] Diş eti oluğu sıvısındaki IL-1β seviyesinin değerlendirildiği farklı çalışmalarda[103, 104] IL-1β seviyesinin periodontitis modellerinde kontrol gruplarına göre 7-12 kat daha yüksek olduğu görülmüştür. IL-1β, periodontitiste yükselen miktarıyla birlikte, hastalık uygun şekilde tedavi edildiğinde meydana gelen azalma patogenezdeki önemli rolünü kanıtlar niteliktedir.[105]

2.1.5.1.3.2. İnterlökin 10 (IL-10)

IL-10, doğal yada kazanılmış immünitenin kontrol edilmesinde önemli role sahip olan bir sitokindir.[106] Aktive olmuş makrofajlardan, dentritik hücrelerden, başlıca düzenleyici T lenfositler olmak üzere T lenfosit alt gruplarından ve B lenfositlerden üretilir.[107, 108] Aktive olmuş makrofaj ve dentritik hücrelerden üretilen IL-10'nun üretildiği bu hücrelerin fonksiyonlarını baskılaması, immün yanıtı kontrol etme mekanizmasına örnek olarak gösterilebilir.[109] IL-10, B lenfosit kaynaklı immün yanıtı stimüle ederken aynı zamanda T lenfositleri özellikle de yardımcı Th1 kaynaklı immün yanıtı baskılar.[110] Enflamasyon sırasında ortaya çıkan fagositer hücre kaynaklı proinflamatuar sitokinlerin etkilerini inhibe eder, IL-1β'nın reseptör antagonisti olan IL-1Rα'nın üretimini artırır.[111] Makrofaj ve dentritik hücrelerde eksprese edilen kostimülatör moleküllerin ve sınıf 2 MHC moleküllerinin üretimini azaltır ve ilgili hücrelerin antijen sunma kapasitelerini kısıtlar.[109]

IL-10 romatoid artrit, pzöriazis gibi kronik enflamatuar rahatsızlıkların tedavisinde immünsüpresif ajan olarak kullanılır.[112, 113] Kronik inflamatuar özellik gösteren periodontal hastalıkların immünopatogenezinde IL-10 büyük bir öneme

sahiptir.[95, 114] Kronik periodontitiste Th1 ve Th2 arasındaki denge IL-10 tarafından Th2 lehine bozulur ve hastalığın ilerlemesi yavaşlatılır. IL-10 eksikliği enflamatuvar süreçte IL-1 artışına sebep olarak doku yıkımını arttırır.[115, 116] IL-10, mevcut alveolar kemik miktarının korunmasında osteoklastların aktive olmasını engelleyerek ve osteoblastların ürettiği kemik miktarını kontrol ederek etkili olur.[117] Doku yıkımında görev alan MMP'lerin oluşumunun engellenmesi ve inhibitörü olan TIMP'lerin makrofajlar tarafından salınımının arttırılması IL-10 doku yıkımının azaltılmasındaki bir diğer fonksiyonudur.[118] Ratlarda deneysel olarak oluşturulan periodontitis çalışmalarında, IL-10 antienflamatuvar etkisi gözlenmiştir.[119]

2.1.5.1.4. Matriksmetalloproteinazlar (MMP)

Matrisinler olarak da adlandırılabilen matriksmetalloproteinazlar ZN ve Ca bağımlı enzimlerdir. Bu enzimler ekstraselüler matriksin neredeyse bütün bileşenlerini bozabilir buna bağlı olarak birçok fizyolojik ve patolojik olayda önemli bir rol oynar.[120] MMP'ler katalitik bölgelerinde substrat olarak metallere (ZN,Ca) ihtiyaç duymaları sebebiyle metal bağımlı endopeptidazlar olarak da bilinirler. İnaktif olarak salgılanan MMP'lerin aktivasyonu yapısındaki çinko- sistein bağının bozulmasıyla gerçekleşir. Üretimleri osteoblast, osteoklast, nötrofil, makrofaj, T lenfosit, fibroblast ve epitel hücreleri gibi birçok hücre tarafından yapılabilir.[121] MMP'lerin oluşturduğu yıkım, serumda α2-makroglobulin, glikoprotein-α1, antitripsin ile dokuda ise TIMP'ler tarafından inhibisyonla kontrol edilir.[122] Toplam 28 MMP bulunmasına rağmen insanlar üzerinde etkili olan 23 farklı MMP çeşidi bulunmaktadır. Bu enzimler substratlarına göre 6 grupta sınıflandırılır: Kollajenazlar (MMP-1,8,13,18), Jelatinazlar (MMP-2,9), Stromelizinler (MMP-3,10,11), Matrilizinler (MMP-7,26) , Membran tip (MT-MMPs), diğerleri (MMP-20) .[120, 123, 124]

MMP ve doku inhibitörleri TIMP'ler peridontal dokularda meydana gelen patolojik yıkımda ve periodontal dokuların fizyolojik şekillenmesinde önemli bir role sahiptirler. Periodontitis sürecinde MMP ve TIMP(TIMP-1) arasındaki dengenin MMP yönünde bozulması doku yıkımıyla sonuçlanır.[125] Herhangi bir patolojik durum bulunmayan periodontal dokularda fibroblast tarafından üretilen MMP'ler (MMP-1 yada kollajenaz-1) peridontal bağ dokusu hücrelerinin ECM devamlılığını sağlamada görevlidirler. Periodontal hastalık durumunda ise meydana gelen enflamayon ile MMP üretiminde artış meydana gelir ve sağlıklı durumun aksine MMP üretimi fibroblast yerine enflamatuar hücreler tarafından (özellikle nötrofil) yapılır.[78, 126] Proenflamatuar sitokinler olan TNF-a ve IL-1ß, MMP'nin bağlandığı reseptör sayısını arttrıcı yönde etki gösteririr.[127] MMP'lerin kemik yıkımıyla olan ilişkisi mevcut çalışmalarda gösterilmiştir[128]. Osteoklastların yıkım sahasına ulaşmasına MMP'ler (MMP-9,14) aracılık eder .[129]

Periodontal doku yıkımında MMP'ler büyük bir role sahiptir. Hastalığın ilerlemesiyle birlikte periodontal dokulardaki MMP-8 ve MMP-9 seviyesiyesinde artış gözlenir.[130] Periodontal hastalığın şiddetini, ilerleme hızını ve tedavi yanıtını en iyi yansıtan ve periodontal dokularda en fazla gözlenen MMP elemanları MMP-8 ve MMP-9' dur.[131]

2.1.5.1.4.1.MMP-8

Periodontitiste MMP-8 (kollajenaz-2) diş eti bağ dokusunda bulunan temel kollajenazlardan biridir.[132] Periodontal dokular değişik tipte birçok kollajen içerse de Tip-1 ve Tip-3 kollajen toplam kollajen miktarının yarısından fazlasını oluşturmaktadır. Tip -1 kollajen yıkımı MMP-1,2,8,9,12,13,14 tarafından yapılmaktadır.[133] MMP-8 farklı kollajen tiplerini hidroliz yoluyla yıkabilir ancak Tip -1 kollajen yıkımını en kısa sürede yapmasıyla diğer MMP türlerinden ayrılır.[120] Yapılan çalışmalarda DOS'da bulunan

kollajen yıkımıyla ilgili aktivitenin %90-95'lik kısmını MMP-8'in sağladığı görülmüştür.[132, 134, 135] Artmış kollajenaz aktivitesinin olduğu DOS'da MMP-8 ve yıkıma uğramış Tip-1 kollajen miktarı arasında bir korelasyon görülmüştür.[136]

2.1.5.1.4.2.MMP-9

MMP 'lerin alt grupları olarak incelenen jelatinazlar MMP-2 (jelatinaz A), MMP-9 (jelatinaz B)'dan oluşmaktadır. Proteinaz olan MMP-9 katalitik alanı ve aktiflenen alanının jelatin aracılığıyla bağlanması yönünden diğer MMP gruplarından ayrılır. Ph derecesi 7'nin altında olduğunda çalışabilen MMP-9, Tip 4,5,7,10,11,14 kollajenleri, ekstraselüler matriks yapı elemanlarını, proinflamatuar sitokinlerin (TNF-α, IL-1β) prekürsörlerini yıkıma uğratır. Ayrıca MMP-9, Tip-1 kollajenin yapısında yer alan polipeptid gruplarının çapraz bağlarını yıkarak kollajen bütünlüğünü bozar.[137, 138] MMP-9 ekspresyonu PMNL hücreleri tarafınan yapılır.[139] MMP-9 ekpresyonun indüklenmesi büyüme faktörleri, kemokinler ve sitokinlere bağlıdır.[140] Sitokin ve büyüme faktörleri mitojenlerle aktive edilmiş protein-kinaz (MAPK) yolunu kullanarak indüklerler.[141] Epidermal büyüme faktörü (EGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), hepatosit büyüme faktörü (HGF), transforme edici büyüme faktörü (TGF) MMP-9 ekpresyonunu arttıran büyüme faktörleriyken, proinflamatuar sitokinler olarak bilinen TNF-α, IL-1β ve interferon (IFN)-a,γ'da MMP-9 ekpresyonunu arttır.[142] MMP-9 aktivasyonu üretildikten sonra hücre dışına çıkmalarıyla olur. Dolaşımda yer alan α2-makroglobulin ve dokuda yer alan TIMP ile inhibisyonları yapılır. Periodontitiste önemli bir yeri olan MMP-9 periodontal dokuların bağ dokularında ekstraselüler matriksinin yıkımı ve hücre migrasyonlarında görev alır. Proenflamatuvar sitokinleri parçalayarak üretimlerini indükler ve aktif form halini almalarını sağlar.[143, 144] Yapılan araştırmalarda periodontitis varlığında DOS'undaki jelatinazların (MMP-2, MMP-9) miktarlarında artış gözlenmiştir. [145, 146]

2.2.Oksidan ve Antioksidan Sistem

ROT iki başlık altında incelenir; son yörüngelerinde bir veya daha fazla boşta elektron bulunduran serbest radikaller ve radikal özellik göstermeyip potansiyel olarak serbest radikale dönüşebilecek olan radikal olmayan moleküller. Her iki grubun birbiriyle olan reaksiyonlarından da serbest radikal oluşabilir. Yaygın olarak bilinen serbest radikaller; nitrik oksit (NO), süperoksit (O_2) ve hidroksil radikalidir (-OH). Radikal oluşturma potansiyeline sahip olan yaygın moleküller ise singlet oksijeni ($^1O2$), hidrojen peroksit (H_2O_2)'tir.[147]

Antioksidanlar, serbest radikallerin vücut içindeki seviyelerini düşük tutan, radikallerin sebep olduğu oksidasyon reaksiyonlarının oluşmasını engelleyerek yada geciktirerek biyokimyasal aktivitelerini kısıtlayan moleküllerin genel adıdır.[81] Antioksidanlar, oluşan süperoksit (O_2), hidrojen peroksit (H_2O_2)'in temizlenmesi ve oluşan iyon hallerinin ayrılması, demirin süperoksitle indirgenip hidrojen peroksitle reaksiyona girerek oluşturduğu hidroksil radikalinin oluşmasını yani fenton reaksiyonlarının engellenmesi, hücre membranı üzerinde koruyucu etkisiyle hidroksil grubunu uzaklaştırarak lipit peroksidasyonu önlemesi, bazı metal iyonlarını bağlayıp oksidasyonun zincir reaksiyonlarının bozulması gibi mekanizmalarla oksidatif stresin meydana gelmesini önler.[148, 149] Antioksidan savunma sistemi ve serbest radikaller arasında normal fizyolojik koşullar altında bir denge bulunur. Oksidatif stres dengenin serbest radikaller lehine bozulmasıyla meydan gelir ve sonucunda muhtemel bir yıkım oluşur.[150] Oksidatif stres kaynaklı bu yıkım DNA yapısında bulunan nükleik asit, lipit, protein, karbonhidrat gibi hücresel yapıyı oluşturan moleküller üzerinden gerçekleşir.[147] Periodontal hastalıkların da içinde bulunduğu kardiyovasküler rahatsızlıklar, DM, psöriazis, otoimmün rahatsızlıklar gibi kronik seyirli hastalıklarda oksidatif stres patogenez açısından büyük bir öneme sahiptir.[151-153]

2.2.1. Malondialdehit

ROT'ların artışının antioksidan savunma sistemleriyle dengelenememesi sonucu lipit peroksidasyonu meydana gelir. Oksidasyon ürünü olan lipid hidroperoksitlerin (LOOH) yıkımı organizmada yüksek akvitiviteye sahip aldehitlerin oluşmasını sağlar. Aldehitler oluştukları hücre bölgesinde etkili olabilir ya da difüzyonla yayılım göstererek meydana getirdikleri hasarın etki sahasını genişletebilir. Lipit peroksidasyonunun nihai ürünlerinden biri malondialdehit (MDA)' dir. MDA ve lipit peroksidasyonu arasında güçlü bir korelasyon mevcuttur. Bu nedenle MDA lipit peroksit düzeylerinin belirlenmesinde kullanılır. ROT nedeniyle oluşan lipit peroksidasyonu oluşturduğu aldehitler membran yapısını bozar ve hücre elemanlarına zarar verir.[154] MDA kalıtım materyali üzerine yaptığı çapraz bağlarla mutajenik ve karsinojenik etkilere sebep olur.[155] Vücutta görülen patoloji sonucu artış gösteren lipit peroksidasyonu, ROT kaynaklı meydana gelen oksidatif hasarın belirteci olarak kullanılabilir.[156] MDA, periodontitis ilişkili lokal ve sistemik oksidatif membran fosfolipid hasar düzeyinin tespitinde de yaygın olarak değerlendirilen bir biyobelirteçdir.[157, 158]

2.2.2. Glutatyon

Glutatyon (GSH) yapısında tiyol grubu ve g-glutamin bağı bulunduran bir moleküldür. Yapısında bulunan yüksek konsantrasyondaki sisteinle glutatyon hücre içinde önemli bir antioksidandır.[159] Glutatyon neredeyse bütün hücrelerde sentezlenir, antioksidan olmasının yanı sıra planlı hücre ölümlerinde, hücrelerin haberleşmesinde, eikasonoidlerin üretilmesinde, hücrelerin indirgenme-yükseltgenme reaksiyonların dengede tutulmasında, detoksifikasyon mekanizmasın çalışmasında görev alır.[160] Glutatyonun tamamına yakın kısmı hücre içerisinde serbest halde sitoplazmada bulunur. Burada sentezlenen glutatyon daha sonra diğer hücre organellerinde gözlenebilir.[161] Oksidatif stres varlığı serbest ve indirgenmiş halde bulunan glutatyonun okside hale

gelmesini sağlar.[162] Hücrede oksidatif stres kaynaklı meydana gelen kalıcı hasar GSH yapısını değiştirir bundan dolayı GSH miktarının belirlenmesi hastalık durumunun anlamlandırılmasında önemli bir göstergedir.[163] GSH, enzim aracılığıyla oksidatif stres sonucu oluşan lipit peroksitleri ve hidrojen peroksitleri detoksifiye eder oluşan serbest radikalleri ve serbest radikal oluşturma potansiyeline sahip molekülleri temizler. Ayrıca bazı antioksidan moleküllerin yeniden oluşmasını sağlar.[164, 165]

2.2.3. Total Antioksidan Kapasite, Total Oksidatif Durum ve Oksidatif Stress İndexi

ROT'un serum ya da plazmadaki miktarlarının belirlenmesinde birçok farklı yöntemden yararlanılmaktadır. Antioksidan savunma sistemi ve oksidan sistem arasında olan denge oksidanlar lehine bozulduğunda bu duruma sebep olan moleküllerin miktarları ayrı ayrı toplanarak bir sonuç elde edilebileceği gibi Erel[166, 167]tarafından geliştirilen ve ilgili moleküllerin total miktarlarını bir bütün halinde ölçmeye olanak sağlayan, ışığın absorplanması esasına göre çalışan otomatik bir yöntem de bulunmaktadır. Serum, plazma ve çeşitli vücut sıvılarında birçok antioksidan molekül bulunmaktadır. Bu moleküller kendi aralarında etkileşim oluşturabilmektedir. Bir patoloji için spesifik bir antioksidanın konsantrasyonun ölçümü, onu etkileyen diğer antioksidan moleküllerin etkisi göz ardı edilerek yapıldığında yetersiz sonuçlar elde edilmektedir. Aynı şekilde spesifik bir antioksidan türünün tek başına ölçümü yapılırken patolojiyle ilgisi olmayan farklı bir mekanizmayla üretilen miktarı da sonuca dahil edilmekte yanlış değerlendirmelere sebep olmaktadır.[168] Bunun yanı sıra tek tek yapılan ölçümler uzun ve karmaşık bir süreç gerektirmekte, diğer yöntemlere göre ekonomik açıdan dezavantaj barındırmaktadır.[169] Total antioksidan kapasite (TAOK), alınan biyolojik numunedeki antioksidanların tamamının antioksidan kapasitelerinin toplamı sonucunda oluşan biyokimyasal bir göstergedir. Uygulama açısından kompleks bir süreç barındırmaz,

ekonomik olarak avantajlıdır ve zamandan tasarruf sağlar. Antioksidan moleküller arasındaki etkileşim sonucu meydana gelen güçlendirici yada zayıflatıcı etkileri gösterir.[170, 171] TAOK'un bu avantajları yanı sıra cinsiyet, beslenme ve yaş faktörlerine bağımlı değişkenlik gösterdiği bilinmektedir. Direk olarak oksidatif stresi ölçebilen total oksidatif durum (TOD) bireysel koşullara bağlı olmaması yönüyle TAOK'dan daha etkili bir parametredir. Yapılan farklı çalışmalarda [172-174] TOD / TAOK oranıyla belirlenen oksidatif stres indexi (OSİ) oksidatif stres seviyesinin belirlenmesinde basit ve tutarlı bir parametre olduğu bildirilmiştir [175, 176]. Periodontal durum ve OSİ arasında kuvvetli bir ilişki bulunmaktadır. Pek çok çalışma OSİ'nin periodontitis ilişkili nihai oksidatif durumun tespitinde pratik ve güvenilir bir belirteç olabileceğini bildirilmektedir.[165, 172, 173]

2.2.4. Reaktif Oksijen Türlerinin Periodontitis Patogenezindeki Rolü

ROT, serbest oksijen radikalleri ve hücre içi, hücre dışı radikal oluşturma potansiyeline sahip olan reaktif moleküllerin tamamını kapsayan genel bir ifadedir.[177] Antioksidan savunma sistemi ise ROT'un olası olumsuz etkilerine yönelik bütün yaşayan organizmalarda bulunan koruyucu bir mekanizmadır.[158] Patolojik bir durum bulunmadığında antioksidan savunma sistemi ve ROT durağan olmayan bir denge içerisindedirler. Bu denge antioksidan savunma sisteminde meydana gelen azalış ya da ROT'da meydana gelen artmış aktivasyon veya üretim artışı sebebiyle bozulduğunda oksidatif stres oluşur. Oksidatif stres, muhtemel hasarlara sebep olabilecek, prooksidanların antioksidanlara baskın olduğu durum olarak tanımlanır.[178] Oksidatif stres hücreler üzerinde lipid peroksidasyonu, oksidasyon sonucu protein yapılarda yıkım, ECM'nin polarize yapısının bozulması, proenflamatuvar sitokinlerin üretiminin arttırılması, kalıcı etkilere sahip olan DNA hasarı gibi durumlara sebep olur.[179] Reaktif oksijen türleri canlıda birçok fizyolojik mekanizmaya dahil olurken, içinde

periodontal hastalıkların da bulunduğu kronik enflamatuvar hastalıkların patogenezinde önemli bir rol oynamaktadır.[180] Periodontal hastalıklarda ilk savunma hattını oluşturan PMNL'lerden içinde ROT'unda bulunduğu birçok antimikrobiyal salınmaktadır.[181] Hücre parçalanması esnasında fagositoz yapan hücrelerde meydan gelen oksidatif patlamalar nedeniyle oluşan oksidatif stresin periodontitis patogenezi ile bağlantılı olduğu bilinmektedir.[182] Kronik enflamasyon sırasında aktive olmuş makrofaj ve PMNL'den salınan ROT antimikrobiyal özellikleri ile koruyucu bir etki yaparken, ECM ve bağ dokusu üzerine yıkıcı etkileri de bulunmaktadır. ROT kaynaklı oksidatif hasar diş eti dokusu, periodontal ligament ve alveolar kemik gibi periodontal dokularda görülür.[183] Periodontitiste oluşan oksidatif stresin lokal dejeneraif etkilerinin yanı sıra sistemik yolla pek çok doku ve organ hasarına da katkı sağlayabileceği gösterilmiştir.[165, 184] Periodontal dokularda sınırlı kalmayıp sistemik olarak etki eden ROT'lara, membran lipitlerinde geri dönüşümsüz olarak meydana gelen lipit peroksidasyonuna, protein yapıların oksidasyonuna sebep olur, hastalık sürecinde toplam antioksidan kapasitede kayıp görülür. Tüm bunlar göz önüne alındığında oksidatif stresin periodontitis patogenezinde önemi görülmektedir. Periodontal dokularda meydana gelen harabiyetin seviyesi oksidatif stresle bağlantılıdır.[81, 175, 185]

2.3. Stres

Stres kelimesi Latince "estrica" ve eski Fransızca "estrece" kelimelerinden türetilmiş olup baskı ve zorlanma anlamlarına gelmektedir. İlk kez Hans Selye tarafından stres kelimesi değişen çevre koşullarına uyum sağlama ve üstesinden gelme mücadelesinde canlı organizmalar tarafından deneyimlenen zorlukları ve zorlanmaları tanımlamak için kullanılmıştır.[186] Canlıda stres oluşturan etmenler stresörler olarak adlandırılır ve bu etmenler fiziksel, emosyonel, psikolojik, sosyal birçok faktörün etkisi altındadır. Ancak stresörün türünden bağımsız olarak vücutta bir stres yanıtı meydana

gelmektedir. Stresle karşılaşıldığında ilk değerlendirme neokorteks ve limbik sistem tarafından yapılır. Hazırlanan cevap hipotalamusa gönderilir. Hipotalamusun temel işlevi uyaranlara karşı vücudun tetikte kalmasını sağlamaktır. Stresöre karşı verilen cevap uzun veya kısa olmasına göre hipotalamustan başlayan farklı mekanizmaları oluşur. Hipotalamus kısa süreli yanıt için otonom sinir sistemini uyararak böbrek üstü bezlerinin adrenal medullasından adrenalin ve nöradrenalin salınmasını sağlar. Uzun süreli yanıtta ise hipotalamustan salgılanan kortikotropin serbestleştirici faktör (CRF) hipofiz ön lobundan adrenokortikotropik hormon (ACTH) salgılatır ve bu hormonun etkisiyle böbreküstü bezi korteksinden kortizol salınımında artış olur. Kortizol salınımı vücut üzerinde glikojenolizin artmasına, karaciğer dışında protein sentezinin azalmasına ve yıkımının artmasına, karaciğerde ise plazma proteinlerinin artışına, yağ depolarından yağ asitlerinin mobilizasyonuna sebep olur. Yüksek miktarlarında lökosit diapedezini, eozonofil ve histamin miktarını azaltır. Lenfoid dokuda atrofiye sebep olarak immunoglobin miktarını azaltır. Katekolaminlerin etkilerini arttırır. Gerçekleşen tüm bu etkiler organizmanın immün cevabının baskılanmasına sebep olur.[187] Akut stres durumunda olduğu gibi kronik stres durumunda da yüksek düzeyde salınan kortizol, akut durumda gösterdiği immünsüpresyon etkisinin aksine kronik stres durumunda gelişen reseptör rezistansı sebebiyle immün cevabı regüle edemez ve proinflamatuar sitokinlerin aşırı salınımı ile karakterize yıkıcı konak yanıtını şiddetlendirir.[7, 21] Farklı stresörlerin vücutta oluşturduğu stres cevabı aynı mekanizmaya sahip olsa da, stresöre mağruz kalınan süre stresin cevabını değiştirir. Ani bir uyaranla meydana gelen akut stres vücut üzerinde hemostatik durumu kısa süreliğine de olsa değiştirerek etki eder, uzun süreli oluşan kronik stres ise etki bakımından akut strese göre düşük seviyeli olmasına rağmen etkisinin kümülatif bir özellik taşımasıyla vücut üzerinde olumsuz etkiler bırakabilir.[188, 189] Selye, stresle karşılaşıldığında oluşturulan yanıtı genel adaptasyon yanıtı (GAS)

olarak tanımlamış ve üç döneme ayırmıştır; alarm evresi, direnme ya da adaptasyon evresi ve tükenme evresi.[190] Stres belirli seviyeye ulaştığında vücut alarm evresine geçer ve ilk yanıtı oluşturur, hipotalamo-hipofizer sistem ve otonom sempatik sistem uyarılır. Uyarılan sempatik sistemin etkisiyle katekolamin seviyelerinde artış, kalp atım hızı ve kan basıncında yükselme, papilerde vazodilastayon, tükrük sekresyonunda azalma, boşaltım sisteminde gevşeme gibi fizyolojik olaylar meydana gelir. Bu fizyolojik olaylar vücudun 'savaş ya da kaç' tepkisini vermesine sebep olur. Oluşan strese karşı adaptif cevap gelişmeye başladığında alarm evresinde sempatik sistem tarafından bozulan hemostatik denge parasempatik sistemin etkileri ile dengelenmeye çalışılır. Alarm metabolizması katabolik reaksiyonlardan oluşurken direnme dönemi anaboliktir. Direnç stresin gücüne, vücudun adaptasyon kabiliyetine ve enerjisine bağlı olarak değişir ve vücut stres etkeniyle en yüksek seviyede mücadele halindedir. Bu mücadele adaptif yanıt lehine sonuçlanırsa oluşan etkiler ortadan kalkar fakat stres etkeni ortadan kalkmaz ve devamlılığını sürdürürse tükenme evresine geçilir. Bu evrede ise adaptif yanıtın giderek azalması sonucu vücut her türlü psikolojik ve fizyolojik hastalığa açık hale gelir ve stres hastalıkları oluşur ancak adaptif yanıt tamamen ortadan kalktığında ölüm gerçekleşir.[191] Yapılan hayvan deneylerinde oluşturulan stres sonucu anlatılan evreler benzer şekilde gelişir; alarm dönemini izleyen direnç evresi deneysel olarak oluşturulan stresin devamlılığıyla yerini hastalıklara yatkın olan tükenme evresine bırakır.[192]

2.4.Periodontitis ve Stres

Periodontitis kronik enflamatuar, polimikrobiyal bir hastalık olup gingival dokularda yıkım ve alveol kemiğinde rezorbsiyonla karakterizedir.[193] Yapılan çalışmalarda popülasyonun yaklaşık %15-17'inde yıkıcı periodontal hastalık gözlenmektedir.[194] Periodontal hastalıkların etiyolojisi multifaktöriyeldir. Hastalık etiyolojisinde bakteriler etkin bir rol oynasa da doku yıkımından tek başına sorumlu

değildir, sigara ve DM gibi çevresel risk faktörleri hastalığın ilerlemesine katkıda bulunmaktadır.[195] Stres, anksiyete ve depresyon gibi diğer faktörler ise mutlak risk faktörü olmamakla birlikte yapılan çalışmalarda periodontal hastalıklar için potansiyel risk faktörü olabileceği bildirilmiştir.[9, 196] Yapılan çalışmalarda depresyon ve stres etkenlerine mağruz kalmak immün sistemi olumsuz etkileyerek periodontal sağlığın bozulmasına yol açar.[197, 198] Psikolojik stresin hücresel immün yanıtı 3 mekanizma ile baskıladığı gösterilmiştir.[199, 200] İlk mekanizma stres kaynaklı oluşan yanıt HPA aksını başlatır, hipofiz bezinden kortikotropin serbestleştirici hormon salınımını ve böbreküstü bezinin korteksinden glukokortikoid hormon salınımını teşvik eder. Suprarenal bölgeden salgılanan glukokortikoid proenflamatuar sitokinlerin (interlökinler, prostoglandinler, tumor nekroz faktör) üretimini azaltır. İkinci mekanizmada ise mağruz kalınan stresörler sempatik sinir sistemini stimüle eder, adrenal medulladan adrenalin ve nöradrenalin salınımını arttırır. Böylece hem kan akış hızında hem de vücut savunmasında görev alan kan elemanlarında azalma olur. Bunun sonucunda immün baskılayıcı bir etki oluşur. Bu etki dolaylı olarak periodontal doku yıkımını katkıda bulunur.[201, 202] Son mekanizmada ise stres duyusal sinir liflerinden nöropeptid salımını tetikler. Nöropeptidlerin varlığı sitokin salınımını uyarır ve damar geçirgenliğini arttırır. Nöropeptid kaynaklı enflamasyon dokularda yıkıma sebep olur.[203] Sonuç olarak stresin immün sistem üzerine olan geniş etkisi, kronik enflamatuar bir hastalık olan periodontitisi de benzer şekilde etkileyebilir. Glukokortikoidler IL-1,IL-2,IL-3, IL-6, TNF, IFN-gamma, granülosit ve monosit koloni uyarıcı faktörlerin üretimini inhibe ederler. Glukokortikoidler ayrıca araşidonik asit metaboliti ve proenflamatuar mediyatörler olan prostoglandinler ve lökotrienleri inhibe eder.[204] Glukokortikodler lipokortinlerin oluşmasını stimüle ederek fosfolipaz A2'yi inhibe eder ve eikasanoidlerin oluşmasını engeller.[205] Glukokortikoidler makrofaj antijen sunumunu, lenfosit proliferasyonunu, sitotoksik ve yardımcı T

lenfositlere farklılaşmayı önler.[206] Glukokortikoidler kortizol dahil olmak üzere immünitede görevli olan IgA, IgG ve nötrofil fonksiyonlarını baskılayarak periodontopatojenlere karşı oluşturulan koruyucu işlevi aksatır. IgA sekresyonu periodontopatojenlerin başlangıç kolonizasyonlarını azaltarak koruyucu etki yapar. IgG ise opsonizasyonda görev alıp nötrofillerin periodopatojenleri fagositozuna yardımcı olur. IgA ve IgG'nin baskılanması periodontal enfeksiyonların yıkıcı periodontitise dönüşmesine sebep olur.[207] Oluşan stresin kronikleşmeye başlamasıyla yüksek düzeyde salınan kortizol, akut stres durumdaki immünsüpresif fonksiyonunun aksine reseptörlerde oluşan rezistans sebebiyle immün yanıtı regüle edemez ve proinflamatuar sitokinlerin aşırı salınımı ile karakterize yıkıcı konak yanıtını şiddetlenir.[7, 21] Adrenal korteksten salınan adrenalin ve nöroadrenalin (katekolaminler) prostoglandin ve proteazlar aracılığıyla periodontal yıkımı arttırır[207].

Paik ve ark.[208] yaptıkları çalışmada akademik stres altındaki bireylerde serum IL-1b , IL-6 ve IL-10 seviyelerinin arttığı IFN gamma üretiminin ise azaldığını bildirmişlerdir. Maes, Goebel ve ark.[209, 210] yaptıkları çalışmalarda travma sonrası stresi olan hastalarda serumda IL-6 seviyesinin arttığı gözlenmiştir. Genco ve ark.[211] stres ve periodontal hastalık arasındaki ilişkinin stres hormonlarına bağımlı bir döngü içerisinde gerçekleştiğini rapor etmişlerdir. Deinzer ve ark.[212] yaptıları çalışmada akademik stres altında bulunan ve gingivitisi olan bireylerde alınan DOS örneklerinde kontrol grubuna göre IL-1ß seviyelerinin 2 kat daha fazla olduğu bildirmişlerdir. Bu sonuç periodontal hastalığın ilerleyişinde stresin önemli bir etken olduğunu düşündürmektedir. Peruzzo ve ark [14] ratlarda üzerinde yaptıkları çalışmada kronik stresin periodontal hastalıklarla olan ilişkisini araştırmışlardır. Restraint stres uygulanarak kronik stres oluşturulan deneysel periodontitisli ratların, stres altında olmayan deneysel periodontitisli ratlara ve kontrol

grubuna göre belirgin biçimde daha fazla alveolar kemik kaybı olduğu, lokal olarak proinflamatuvar ve prorezorptif faktörlerin arttığı bildirilmiştir.

Deneysel[9, 11-16, 213] ve epidemiyolojik[209, 210] çalışmalar göstermiştir ki; psikolojik faktörler periodontitis gelişmesine olan yatkınlığı arttırabilir. Bu konu üzerine yapılan çalışmalarla stres ya da psikolojik faktörler ile periodontal hastalıklar arasında pozitif ilişki saptanmıştır.[9, 11-16, 213]

2.5. Melatonin

2.5.1. Melatonin Hormonu ve Özellikleri

Melatonin büyük oranda pineal bezden salgılanan vücutta birçok biyolojik aktivitenin düzenlenmesinde yer alan endojen bir nörohormondur. Pinealositlerde esansiyel bir aminoasit olan triprofandan sentezlenir. Dolaşımdan hücre içine alınan triptofan önce triptofan hidroksilaz enzimi ile 5-hidroksitriptofan'a daha sonra ise L-aminoasid dekarboksilaz enzimi ile 5-hidroksitriptamin'e (serotonin) dönüşür. Serotonin daha sonra N-asetil transferaz (NAT) enzimi aracılığı ile asetillenerek N-asetilserotonin'e dönüşür. N-asetilserotonin ise hidroksi-indolmetil transferaz (HIOMT) ile melatonine dönüşür.[22, 214] Dolaşımdaki melatoninin yaklaşık %80 pineal bez tarafından salgılanır. Bunun dışında retina, lacrimal bez eritrosit, trombosit, gastrointestinal sistem, harderian bez gibi yapılarda da melatonin sentezlenmesine rağmen dolaşımdaki melatonin seviyesine katkısı yoktur.[215, 216] Melatonin sirkadyan ritim ile ilişkili bir hormon olduğundan salınımı için çevrenin aydınlık ya da karanlık olması en önemli etkendir. Dolaşımda yer alan melatonin miktarının büyük bölümü gece saatlerinde salgılanmaktadır ve günde 30mg melatonin üretilmektedir. Salgılanması 21.00-22.00 saatlerinde başlar, 02.00-04.00 saatleri arasında pik seviyeye ulaşır, sabah 07.00-09.00 saatleri arasında azalmaya başlar. Gündüz plazma melatonin konsantrasyonu 0-20 pg/dl değerinde iken gece bu değer 3-10 katına yükselir.[217, 218]

Melatonin sahip olduğu yüksek lipofilik ve hidrofilik özellikleri nedeniyle plazmadan birçok biyolojik sıvıya kolayca geçebilir bu da biyolojik sıvılardaki konsantrasyonunu plazmadaki konsatrasyonuna göre yüksek kılar. Hücre hemostazının korunmasında gerekli olan melatonin bu geçiş özellikleriyle hücreler için temin edilir.[219] Plazmada bulunan melatoninin yarısından fazlası albümine bağlı olarak bulunur. Yarılanma ömrü 3-45 dakikadır. Melatonin neredeyse tamamı karaciğerde hidroksilasyonla metabolize olurken, çok az miktarda böbrekte de metabolize olur ve %50-80 sülfürik , %5-30 glukuronik asit ile konjuge olduktan sonra idrarla atılır.%1'lik kısmı ise değişime uğramadan idrarla atılır.[217]

2.5.2. Melatonin Hormonunun Etkileri

Melatonin vücutta birçok biyolojik aktivitenin düzenlenmesinde yer alan endojen bir nörohormondur.

Melatonin, uyku ve uykusuzluk: Uyku düzenlenmesinde ana faktör ışığa veya karanlığa maruz kalınmasıdır. Retinaya gelen ışık sinirsel olarak iletildiğinde uyarılan suprakiazmatik nukleus vücut ısısının, uyku ve uyanıklık hissinin, endokrin olayların dahil olduğu birçok fizyolojik olayları başlatır. Suprakiazmatik nukleus bir biyolojik saat gibi çalışır.[220] Işık varlığında melatonin salınımı pineal bezin aktif olmaması sebebiyle engellenir. Karanlık ortam varlığında pineal bez uyarılır ve melatonin salınımı başlar. Melatonin salınımı için uyku şart değildir; karanlık ortamın, melatoninin toplam uykuda kalım süresinden çok uykudan uyanıklığa geçiş, uykunun başlangıcı ve uykunun kalitesiyle ilişkili olduğu bulunmuştur. Melatoninin uyku üzerindeki etkileri vücut ısısını düşürmesi ve düzenlemesiyle ilişkilendirilmiştir.[221, 222]

Termoregülasyon etkisi: Melatoninin vücut ısısını düşürmesi, merkezi vücut ısısının düşmesi, çevresel cilt ısısının yükselmesiyle gerçekleşir. Vücut ısısının düzenlenmesi hipotalamusun preoptik nukleusunda gerçekleşir. Melatonin dört

reseptöründen biri olan MT1 termoregülasyondan sorumlu reseptörüdür. Fiziksel efor sarf edildiğinde vücut ısısının düzenlenmesi dolaşımda yer alan melatonin düzeyiyle bağlantılı olduğu gözlenmiştir.[223] Bunun sonucu olarak melatonin fiziksel efor sırasında vücut sıcaklığının artışının kontrol altına alınması ve fiziksel performasın arttırılmasında rol oynar.

Endokrin etkisi: Melatoninin reproduktif sistem üzerine baskılayıcı etkisi bulunmaktadır. Melatonin hipotalamus düzeyinde GnRH (Gonadotropin-releasing hormon), hipofiz düzeyinde ise ikincil haberciler olan Ca^{+2} ve cAMP seviyelerini değiştirerek LH salınımını inhibe eder.[24] Yüksek düzeylerde melatonin menstruel döngü sırasında LH ve FSH seviyesinin artışını engeller, bundan dolayı progesteronda artış olmaz.[224] Melatonin ve kortizol hormonu düzeyleri zıt yönde değişkenlik gösterir. ACTH aracılı kortizol sentezinin inhibe edilmesi böbrek üstü bezlerinde bulunan melatonin reseptörlerinin uyarılmasıyla olur.[225] Melatoninin tiroid hormonu üzerine olan etkisi direkt veya indirekt yoldan olabilir. Melatoninin hem TSH hem de tiroid hormon miktarını azalttığı ve dolaşımda bulunan hormonların seviyeleriyle melatonin seviyesi arasında negatif bir ilişki olduğu gösterilmiştir.[226]

Kardiyak etkisi: Melatonin kalp debisi, kan basıncı, kalp atış hızı gibi kardiyovasküler sistem fonksiyonlarını etkilemektedir. Tüm bu fonksiyonlara olan etkisini suprakiazmatik nukleus ve melatonerjik sistem aracılığıyla gerçekleştirdiği düşünülmektedir. Melatoninin salgılanmasından ana sorumlu olan pineal bezin ratlarda çıkarılması kan basıncının artışına sebep olurken, deneysel olarak hipertansiyon oluşturulmuş ratlarda melatonin tedavisi arteriyal kan basıncını, kalp atış hızını ve barorefleks yanıtlarını azaltır. Melatonin vazokonstrüksiyon veya vazodilatasyonla sonuçlanan bazal arteriyal tonusu etkilemese de yararlı olan etkilerini reseptör aracılı cAMP seviyesinde azalma ve sinyal iletisinde görev alan moleküllerin artmış hidroliziyle

sağlar.[26] Melatoninin MT2 reseptörleri aracılığıyla endotel hücrelerini aktive ederek düz kaslarda cGMP üretiminde artışa neden olur bunun sonucunda endotel hücrelerinde vazodilatasyon meydana gelir. Melatonin mitokondriyal düzeyde serbest radikalleri temizler bu yönüyle iskemik kalp hastalıklarının tedavisinde önemlidir ve iskeminin neden olduğu miyokardiyal hasara karşı koruyucu bir etkiye sahiptir.[227]

Antioksidan etkisi: Melatonin hidrofilik ve lipofilik özellikleri sayesinde bütün hücre içi yapılara kolayca ulaşabileceğinden hücre membranını, nükleusunu ve organellerini serbest radikallerin oluşturacağı hasardan korur. Hücre membranının dış tarafına tutunan melatonin, serbest radikallerin membran ile olan temasını engeller ve koruyucu bir rol oynar. Mitokondriyal solunum sonucu ortaya çıkan oksijen (O_2), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil (-OH), gibi radikallerin güçlü temizleyicisidir.[228] Melatonin serbest radikaller tarafından metabolize edilir ve antioksidan potansiyeli sağlayan siklik 3-hidroksi melatonine dönüştürülür aynı zamanda antioksidan aktiviteye sahip olan süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalazı uyarır.[23] Toksik moleküller sebebiyle oluşan serbest radikaller ve oksidatif stres melatoninin antioksidan aktivitesiyle düzenlenebilir.[229]

Yaşlanma üzerine etkisi: Yaşın ilerlemesiyle pineal bezde meydana gelen değişiklikler melatonin üretimini kademeli olarak azaltmaktadır. Melatonine ait sirkadyan ritim yenidoğan 3-4. ayda başlar, 3-5 yaş aralığında pik yapar ve yaşlanmanın etkisiyle giderek azalır.[230] Yaşlılıkla meydan gelen pinealositlerin hücre zarında yer alan hem a-adrenerjik hemde b-adrenerjik ve reseptörlerinde azalma, suprakiazmatik çekirdek hücrelerinde meydana gelen dejenerasyon üretilen melatonin miktarının azalmasının nedenleridir.[231] Melatonin serbest radikalleri üzerinde antioksidan etkisi yaşlanmayla birlikte azaldığından hücreler serbest radikallerden daha fazla etkilenir hale gelmektedir.[232] Yapılan bir çalışmada genç ratların pineal bezleri yaşlı ratlara

yerleştirilmiştir. Bu durumun sonucu olarak yaşlanma periyodunun geciktirilidiği ve hayatta kalım sürelerinin uzadığı görülmüştür.[233]

İmmün sisteme etkisi: Melatonin hormonunun inhibisyonu ile birlikte reseptör aracılı humoral ve hücresel yanıt azalmakta ve immün yanıt baskılanmaktadır. Melatonin reseptörler aracılığıyla etkisini göstererek dalaktaki splenosit hücrelerinin çoğalmasını sağlar. Lenfositler üzerindeki reseptörleriyle yardımcı T lenfositlerin aktivitesini artırır. Bunun sonucunda opioid moleküllerde ve antikor üretiminde artış meydana gelir. Bunun yanısıra MHC-2 moleküllerinin artışını sağlar. Makrofaj, T lenfositlere antijen sunumunu kolaylaştırır. Monosit ve makrofajların üretiminde gerekli olan granülosit makrofaj koloni stimülan faktörü (GM-CSF) artırmaktadır. B lenfositler üzerinde MT-2 reseptörünü kullanarak apopitozu engeller. Stres sonucu immün sistemde meydana gelen baskılanmanın önlenmesi melatoninin T lenfosit üzerinde interferon-gama (IFN-gama), interlökin IL-2, IL4,IL-6, IL-10 ve IL-12 artışıyla sağlanır.[234] Ratlar üzerinde yapılan çalışmalarda pineal bezi çıkarılan ratların immün yanıtlarının baskılandığı, NK(natural killer) hücrelerinin stimülasyonunda azalma olduğu, timüs ve dalak hücrelerinde atrofi meydana geldiği görülmüştür.[235, 236] Dahası, ratlara eksojen melatonin verilmesi görülen bu değişiklikleri geriye döndürmüştür.[237] Melatoninin immün yanıta etkisini inceleyen farklı çalışmalarda [238, 239] da melatoninin immün fonksiyonu düzenlediği görülmektedir. Bu sonucu olarak da melatonin uygulamasının immün sistem için özellikle de hücresel immünitenin aktivasyonu için önemli olduğu düşünülmektedir.[240] Stres, immünsupresif ilaç kullanımı, viral kökenli hastalıklar ve yaşlanma kaynaklı immün mekanizmada meydana gelen olumsuz etkiler melatonin kullanımı ile engellenebilir.[241]

2.6. Melatonin ve Periodontitis

Literatürde Melatoninin periodontitisin önlenmesi veya tedavisindeki rolünü araştıran pek çok *in vivo* ve *in vitro* çalışma yer almaktadır.[28, 242-245] Melatonin periodontal

kemik yıkımında önemli bir role sahip olan OPG/RANK/RANKL molekül üçlüsünün salınımı düzenler. Melatonin osteoblastın proliferasyonu, farklılaşması ve aktivasyonunda rol oynar. RANKL salınımını azaltırken osteoblastlardan salınan OPG miktarını artırır, osteoklastların farklılaşmasını inhibe eder. Bu yönüyle osteoklastogenezis sürecini baskılanmış olur.[246] Melatonin aynı zamanda tip 1 kollajenin üretimini uyarırken osteopontin, kemik sialoprotein ve osteokalsini artırırarak kemik oluşumunu pozitif yönde etkiler.[247]

Melatoninin bilinen antioksidan ve antienflamatuar etkisi, periodontal hastalık sürecinde enflamatuar duruma etki ederek, organizmanın defansif cevabını düzenlemektedir.[244] Kara ve ark.[248] ratlar üzerinde yaptıkları çalışmada melatonin uygulanan deneysel periodontitisli ratlarda oksidatif stresin oluşturduğu yıkımın periodontal dokularda belirgin bir şekilde azaldığını bildirmişlerdir. Buna paralel olarak Arabacı ve ark.[249] deneysel periodontitis oluşturulmuş ratlar üzerinde yaptıkları çalışmada melatonin uygulanmış grupta alveoler kemik rezorpsiyonunun önemli ölçüde azaldığı ve melatoninin periodontal dokularda iyileşme gösterdiğini bildirmişlerdir. Köse ve ark.[173] deneysel periodontitis oluşturulan diabetik ratlarda sistemik melatonin uygulamasının, dişeti dokusunda oksidatif lipit ve DNA hasarını önemli ölçüde sınırlandırdığını, hücre içi antioksidan olan GSH seviyelerinin ve serum TAOK düzeylerinin arttığını, TOD ve OSİ düzeylerinde ise düşüş görüldüğünü raporlamışlardır. Hidrofilik ve lipofilik özelliği sayesinde ağız boşluğuna kadar ulaşabilen melatonin tükrük sayesinde periodontal dokular için olumlu etkilerden bahsedilebilmektedir. Yapılan birçok çalışmada[246, 250] periodontal hastalık sürecinde değişen tükürük melatonin düzeyi değerlendirilmiş ve çalışmaların sonucunda hastalığın ilerlemesiyle tükürük melatonin düzeyinde azalma olduğu gözlenmiştir. Tüm bu bulgular melatoninin

periodontitis tedavisinde umut vaat edici bir konak modülatör ajan olabileceğini düşündürmektedir.[246]

2.7. Stres ve Melatonin

Canlılarda, psikolojik stres ROT üretimini tetiklemesi ve antioksidan cevabı baskılaması yoluyla oksidatif bir duruma neden olur [251] Bunun yanı sıra NO üretimini inhibe ettiğide gösterilmiştir.[252] Serbest oksijen radikallerinin, stres etkisiyle oluşması hipotalamo-pitüer-adrenal aksı aktive etmesiyle mümkün olur. ROT'un aşırı üretimi irreversibl hücre hasarı meydana getirir.[253] Strese karşı vücutta verilen yanıt, farklı moleküler yolların aktive olmasıyla oksidatif strese ve sonucunda apopitoz yoluyla hücre ölümüyle sonlanır.[254, 255]

Melatonin, psikolojik stresin oluşturduğu oksidatif stresin aksine güçlü bir antioksidan[23-25] olup stresin, aktive ederek ROT'un oluşmasını sağladığı HPA aksının önemli bir inhibitörüdür.[256-259]

Melatonin pineal bezden karanlık ortam sağlanmak koşuluyla salgılanan endojen bir antioksidandır. Toplam uykuda kalım süresinden ziyade uykudan uyanıklığa geçiş, uykunun başlangıcı ve uykunun kalitesiyle ilişkili olduğu bulunmuştur. Bu bağlamda melatoninin salınımı uyku bozukluklarıyla yakından ilgili olabilir.[221, 222]

Stres ve uykusuzluk birbirini nedensel olarak etkileyen iki durumdur. Uyku bozuklukları ve stres arasında aşamalı bir bağlantı bulunmaktadır. Bir incelemede Medic ve ark.[260] uyku bozukluğunun, streste olduğu gibi ilk olarak HPA eksenini aktive etmesinin ardından kortizol ve katekolamin salgılarını arttırması, insülin duyarlılığında ve leptin'de azalma ile birlikte iştahta bir artış meydana getirmesi gibi çok sayıda olumsuz fizyolojik etkiye yol açtığını bildirmiştir. Ayrıca, uyku bozukluğunun TNF-α, IL-1ß, IL-6 gibi inflamatuar sitokinleri ve ROT salınımını arttırdığı ve melatonin üretimini azalttığı bilinmektedir. [10, 260]

Strese cevap olarak aktive olan HPA aksının salgısını arttırdığı glukokortikoid kemik metabolizması üzerinde önemli değişikliklere sebep olur. Glukokortikoid, NF-KB'nin aktivasyonunu arttırarak RANK sinyali yoluyla kemik yıkımına katkıda bulunabileceğini[261, 262] ayrıca stromal ve osteoblastik hücre dizisinde RANKL ekspresyonunu arttırdığı ve OPG ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir.[263, 264] Bunun yanı sıra yine stresle birlikte artan katekolaminlerin, osteoblastlar ve osteoklastlar üzerindeki B-adrenerjik reseptör aktivasyonunu sağladığı ve RANKL ekspresyonunu artırarak osteoklast farklılaşmasına neden olduğu gösterilmiştir [262, 265]

Melatonin ise stresin kemik metabolizması üzerinde oluşturduğu etkileri tersine çevirecek şekilde OPG/RANK/RANKL molekül üçlüsünün salınımı düzenler. Melatonin osteoblastın proliferasyonu, farklılaşması ve aktivasyonunda rol oynar. RANKL salınımını azaltırken osteoblastlardan salınan OPG miktarını artırır, osteoklastların farklılaşmasını inhibe eder. Bu yönüyle osteoklastogenezis süreci baskılanmış olur.[246] Melatonin aynı zamnda tip 1 kollajenin üretimini uyarırken osteopontin , kemik sialoprotein ve osteokalsini artırırarak kemik oluşumunu pozitif yönde etkiler.[247]

Melatonin ve stresin çeşitli mekanizmalarla farklı yönlerde etkileyebildiği pro-antienflamtuar, oksidan-antioksidan, kemik yapım-yıkım süreçleri çalışmamızda periodontal dokularda periodontitisin etkisiyle birlikte incelenmiştir.

Tüm bu bilgiler ışığında, bu tez çalışmasını, güçlü antioksidan, antiinflamatuar ve immün düzenleyici etkilere sahip olan melatoninin sistemik uygulamasının psikolojik stres ile ilişkili periodontal inflamatuar değişiklikler ve doku yıkımını sınırlandırabileceği hipotezi temelinde planladık. Bilgilerimize göre bu çalışma melatoninin stres ile ilişkili periodontal doku yıkımı üzerine önleyici etkilerini biyokimyasal, histolojik ve immünuhistokimyasal olarak incelemeyi amaçlayan ilk çalışma olma özelliğine sahiptir.

3. MATERYAL VE METOD

Bu çalışmanın deney protokolü Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi (RTEÜ) Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından incelenmiş ve 2019/36 sayılı etik kurul onayı ile deney hayvanlarının hayat kalitesi ve refahı gözetilerek etik kurul yönergesinde belirtilen kurallara uygun şekilde deneysel çalışma gerçekleştirilmiştir. RTEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi TDH-2020-1089 nolu proje çalışmaya katkıda bulunmuştur.

3.1. Deney Hayvanlarının Temini ve Barındırılması

Bu deneysel çalışma RTEÜ Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde gerçekleştirildi. Çalışma için kullanılan deney hayvanları 250-300 gram (gr) ağırlık aralığında her grupta 8 hayvan olacak şekilde toplam 48 adet 4-6 aylık Sprague Dawley cinsi erkek rat olarak seçildi. Kullanılan tüm hayvanların, Ulusal Bilimler Akademisi tarafından hazırlanan ve Ulusal Sağlık Enstitüleri tarafından yayınlanan "Laboratuvar Hayvanlarının Bakımı ve Kullanımı Kılavuzu" nda belirtilen kriterlere göre gerekli olan bakımı yapıldı. Biyolojik ve fizyolojik olarak aynı özelliklere sahip bu hayvanlar; deney hayvanları ünitesinde hijyenik koşullar altında, 21 ± 2°C ortam sıcaklığında, %58 bağıl nem oranına sahip, ışık periyodunun 6.00-19.00 saatleri arasında sağlandığı ortamda muhafaza edildi. Ratlar içeriği Tablo 3.1'de gösterilen standart pellet rat yemi (270 kcal / 100 gr, Bayramoğlu Yem, Erzurum, Türkiye) ile beslendi .[266] Restraint stres uygulandığı zaman dilimi (20:00 ile 08:00 saatleri arasında) haricinde suya sınırsız erişimleri (ad libitum) sağlandı. Temin edilen ratların laboratuvar koşullarına adaptasyonu için 1 hafta beklendi. Takiben ratlar rastgele olarak 6 gruba ayrıldı: Kontrol , stress (S), deneysel periodontitis (DP), stres + deneysel periodontitis (S-DP), stres + melatonin (S-Mel), stres + deneysel periodontitis + melatonin (S-DP-Mel).

Tablo 3.1. Deney hayvanlarına verilen standart pellet rat yeminin içeriği

Standart Pellet Rat Yeminin İçeriği	%
Yağ	3.5
Karbonhidrat	7.5
Protein	23
Vitamin ve Mineral	1-2
Diğer Eser Elementler (demir, selenyum, manganez, çinko, kobalt, iyodür)	3

3.1.1. Çalışma Grupları

1-)Kontrol grubu (K): Bu gruba 8 rat dahil edildi. Ratların alt 1. molar dişlerine ligatür bağlanmadı. Kronik kısıtlama(restraint) stresi uygulanmadı. 29. günden itibaren 14 gün boyunca intraperitoneal olarak gece 11:00 de 10 mg/kg günlük tek doz şeklinde salin uygulandı. 43. günün sonunda hayvanlar sakrifiye edildi. Sakrifiye edilmeden önce serum örnekleri toplandı.

2-) Stres grubu (S): Bu gruba 8 rat dahil edildi. Ratların alt 1. molar dişlerine ligatür bağlanmadı. Kronik kısıtlama (restraint) stresi oluşturmak üzere ratlar, uyum sürecinin ardından 12 saat/gün stres olmak üzere 36 gün süre ile her gün, kendi etrafında dönmeye ya da harekete imkan vermeyecek kafeslerde tutuldu. Bu ratlara 29. günden itibaren 14 gün boyunca intraperitoneal olarak gece 11:00 de 10 mg/kg günlük tek doz şeklinde salin uygulandı. 43. günün sonunda hayvanlar sakrifiye edildi. Sakrifiye edilmeden önce serum örnekleri toplandı.

3-) Deneysel Periodontitis Grubu (Dp): Bu gruba 8 rat dahil edildi. Uyum sürecinin ardından oral bakterilere retansiyon sağlaması için, alt 1. molar dişlerinin boynuna (kole) 3.0 ipek suturların subgingival- paramarjinal konumda yerleştirilmesi

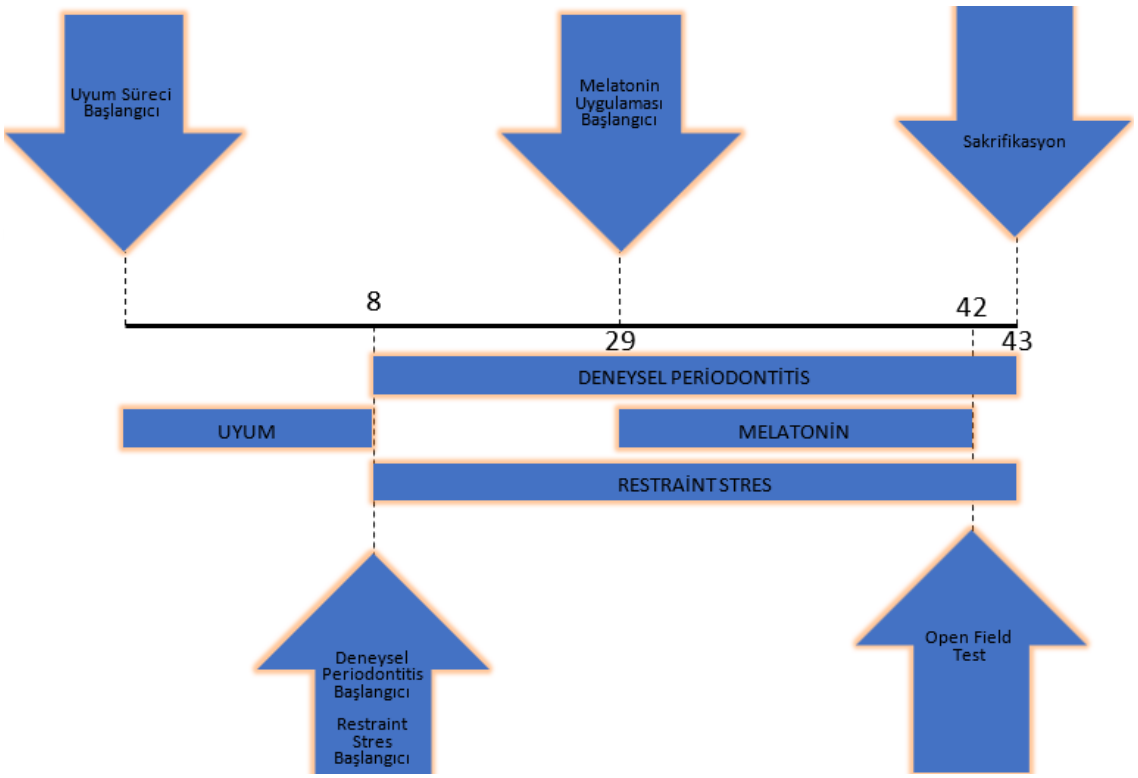
yöntemi ile deneysel periodontitis oluşturuldu. Bu ratlara 29. günden itibaren 14 gün boyunca intraperitoneal olarak gece 11:00 de 10 mg/kg günlük tek doz şeklinde salin uygulandı. 43. günün sonunda hayvanlar sakrifiye edildi. Sakrifiye edilmeden önce serum örnekleri toplandı.

4-) Stres + Deneysel Periodontitis Grubu (S-Dp): Bu gruba 8 rat dahil edildi. Uyum sürecinin ardından oral bakterilere retansiyon sağlaması için, alt 1. molar dişlerinin boynuna (kole) 3.0 ipek suturların subgingival- paramarjinal konumda yerleştirilmesi yöntemi ile deneysel periodontitis oluşturuldu. Ligatürleme gününden itibaren başlamak üzere, kronik kısıtlama(restraint) stresi oluşturmak üzere ratlar 12 saat/gün stres olmak üzere 36 gün süre ile her gün, kendi etrafında dönmeye ya da harekete imkan vermeyecek kafeslerde tutuldu. Bu ratlara 29. günden itibaren 14 gün boyunca intraperitoneal olarak gece 11:00 de 10 mg/kg günlük tek doz şeklinde salin uygulandı. 43. günün sonunda hayvanlar sakrifiye edildi. Sakrifiye edilmeden önce serum örnekleri toplandı.

5-) Stres + Melatonin Grubu (S-Mel): Bu gruba 8 rat dahil edildi**.** Ratların alt 1. molar dişlerine ligatür bağlanmadı. Kronik kısıtlama(restraint) stresi oluşturmak üzere ratlar, uyum sürecinin ardından 12 saat/gün stres olmak üzere 36 gün süre ile her gün, kendi etrafında dönmeye ya da harekete imkan vermeyecek kafeslerde tutuldu. Bu ratlara 29. günden itibaren 14 gün boyunca intraperitoneal olarak gece 11:00 de 10 mg/kg günlük tek doz şeklinde melatonin uygulandı. 43. günün sonunda hayvanlar sakrifiye edildi. Sakrifiye edilmeden önce serum örnekleri toplandı.

6-) Stres + Deneysel Periodontitis + Melatonin Grubu (S-Dp-Mel): Bu gruba 8 rat dahil edildi. Uyum sürecinin ardından oral bakterilere retansiyon sağlaması için, alt 1. molar dişlerinin boynuna (kole) 3.0 ipek suturların subgingival- paramarjinal konumda yerleştirilmesi yöntemi ile deneysel periodontitis oluşturuldu. Kronik kısıtlama(restraint)

stresi oluşturmak üzere ratlar, uyum sürecinin ardından 12 saat/gün stres olmak üzere 36 gün süre ile her gün, kendi etrafında dönmeye ya da harekete imkan vermeyecek kafeslerde tutuldu. Bu ratlara 29. günden itibaren 14 gün boyunca intraperitoneal olarak gece 11:00 de 10 mg/kg günlük tek doz şeklinde melatonin uygulandı. 43. günün sonunda hayvanlar sakrifiye edildi. Sakrifiye edilmeden önce serum örnekleri toplandı. (Şekil 3.1.)



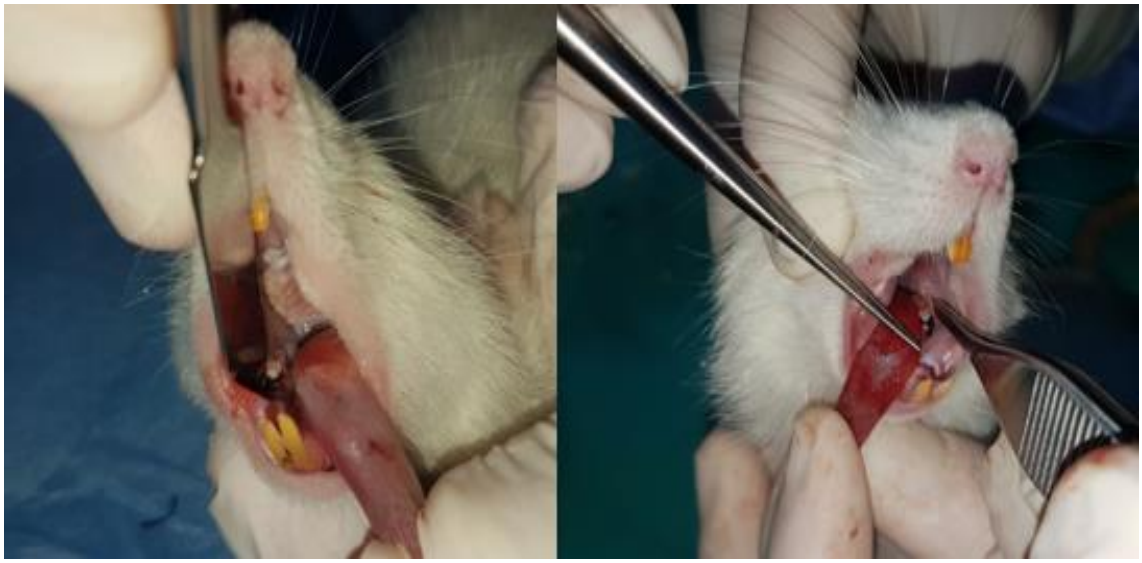
Şekil 3.1. Deney şeması

3.2. Ligatür ile Periodontitis İndüksiyonu

Ratlar üzerinde deneysel periodontitis modeli oluşturmak amacıyla intraperitoneal olarak ksilazin hidroklorid (Rompun, Bayer, İstanbul, Türkiye) 10 mg/kg ve ketamin hidroklorid (Ketalar, Pfizer, İstanbul, Türkiye) 40 mg/kg enjeksiyonlarıyla anestezisi sağlandı. Gerek görülmesi durumunda başlangıç dozunun 1/5' i oranında belirli aralıklarla tekrar edildi. Daha sonra hem sağ hem sol alt 1.molar dişlerinin servikal bölgesine sub-paramarjinal pozisyonda 3.0 ipek sütur geçirilerek meziyal tarafta düğümlendi ve sütur 5 hafta süre ile yerinde muhafaza edilerek deneysel periodontitis

oluşturuldu. Sütür, yapısı ve pozisyonu ile ilişkili olarak plak birikimine, inflamatuar değişikliklere ve sonuç olarak periodontitis oluşumuna imkan tanındı (Şekil 3.2. , Şekil 3.3.).[173, 267, 268]

Şekil 3.2. Ratlara ligatür bağlanması (1)



Şekil 3.3. Ratlara ligatür bağlanması (2)

3.3. Restraint (kısıtlama) stres deney protokolü

Restraint stres, hayvanların belirli bir süre boyunca hareket etmesine izin verilmeyen immobilizasyon stresinin değiştirilmiş bir şeklidir. Sinirsel ve ve endokrinal tepkiler restraint stresin, immobilizasyon stresine göre daha az yoğun bir stres etkeni olduğunu ortaya koymasına rağmen akut ve kronik olarak uygulanabilen restraint stresin kullanım sıklığı immobilizasyon stresine göre daha fazladır. Restraint stres, deney hayvanının iyi havalandırılmış plastik bir tüpe, kaba ya da tel örgülü bir kafese koyulmasıyla yapılır. Restraint stresin uygulandığı zaman diliminde hayvanın hareket aralığı oldukça kısıtlanır.[269]

Deney hayvanlarından stres(S), stres-melatonin(S-Mel), stres-deneysel periodontitis(S-DP), stres-deneysel periodontitis-melatonin(S-DP-Mel) gruplarında bulunan 32 rat, 1 haftalık uyum süresinin ardından 36 gün süreyle 20:00 ile 08:00 saatleri arasında 12 saat/gün olmak üzere restraint strese maruz bırakıldı. Ratlar gece hayvanları oldukları için belirtilen zaman dilimi uygun görüldü. Stres protokolü sırasında stres uygulanmayan ratlar da dahil olmak üzere yiyecek ve su kısıtlaması uygulandı. Stres protokolü uygulanan tüm ratlar sabah olunca ana kafeslerine tekrar yerleştirildi. Ratların her biri ayrı olarak üzerinde havalandırma delikleri bulunan pleksiform malzemeden yapılmış, kendi etrafında dönmeye ya da harekete imkan vermeyecek kadar dar (10cmx10cmx20cm) kapalı kafeslere (Şekil.3.4.) yerleştirildi. Mevcut kafesler hergün %70 etanol çözeltisi ile temizlendi. Uygulanan deney protokolü daha önce uygulanan çalışmalardan [14-16] mevcut rat türü, boyutu ve melatonin uygulama süresi düşünülerek modifiye edildi.

Şekil 3.4. Restraint stres kafesleri

3.4.Melatonin Uygulanması

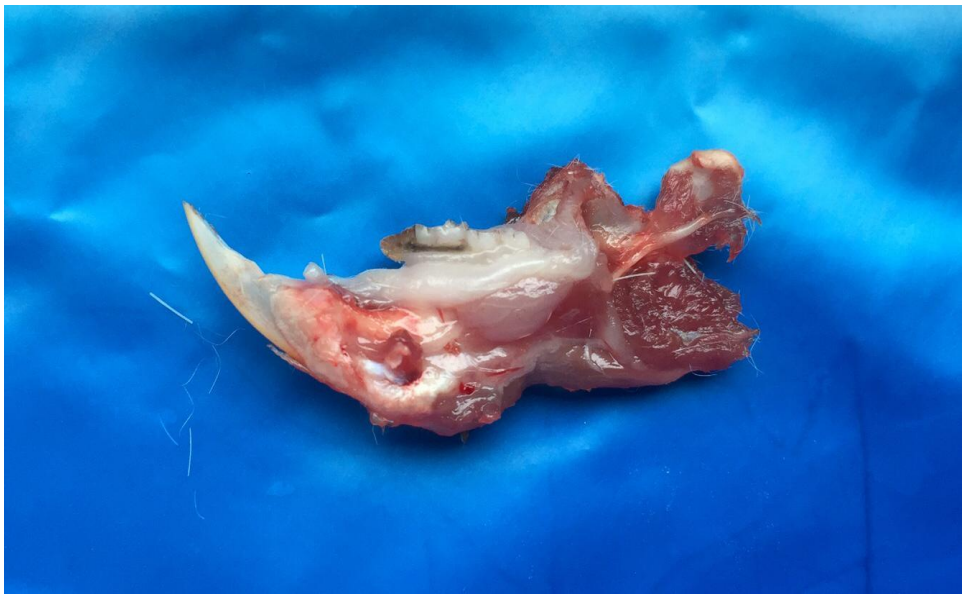
Melatonin (Alfa Aesar GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Almanya) günlük uygulanacak miktarı %0.01'lik serum fizyolojik-etanol çözeltisi içinde çözdürüldü. Oluşan bu karışım vortekslenerek homojen hale getirildi. Çalışmanın 29. gününde uygulanmaya başlayan melatonin önceki çalışmalara[173, 267] benzer şekilde 14 gün süre ile intraperitoneal olarak gece 11:00 de 10 mg/kg günlük tek doz şeklinde insulin enjektörü ile uygulandı. Kontrol, Dp ve stres gruplarında ise aynı metodolojiyle salin uygulaması yapıldı. Deney öncesi ve deney boyunca düzenli aralıklarla ratların ağırlıkları ölçüldü ve hayvanların değişen ağırlıklarına göre tartı (Amput Electronic Technology Co., Shenzhen, Guangdong, Çin) kullanılarak melatonin doz miktarında güncelleme yapıldı.

3.5. Örneklerin toplanması ve hazırlanması

Deneyin tamamlanmasının ardından 43. günde tüm gruplara daha önce anlatıldığı gibi anestezi sağlandı ve 10 ml'lik enjektörler ile intrakardiyak sol ventriküler kan örnekleri toplandı. Toplanan kan örnekleri + 4°C'de 1739 g'de 15 dk süre ile santrifüj edilerek serum örnekleri elde edildi. Elde edilen kan serumları (süpernatantlar) eppendorf tüplere koyularak -80°C derin dondurucuda(thermo scientific TLE series) (şekil.3.5.) analiz edilecek güne kadar muhafaza edildi. Ratların kanları alındıktan hemen sonra öldürücü doz sodyum pentobarbital enjeksiyonu (50 mg/kg) ile ötenazi uygulandı. (Ötenazi: LT, KA) 1. molar dişleri içeren mandibular dokular çevresindeki dokular ile

birlikte çıkarıldı (şekil.3.6.) Sağ mandibula örnekleri histolojik (histomorfometrik ve immünohistokimyal) analizlerde, sol mandibular dişeti dokulari ise biyokimyasal analizlerde kullanilmak üzere %10 nötral formaldehit solüsyonu içeren kaplara aktarıldı. Hem histolojik hem de biyokimyasal incelemeler, çalışma grubu tayininden habersiz iki uzman araştırmacı tarafından gerçekleştirildi. (Histoloji: TM, LT; Biyokimya: KA, AY)

Şekil.3.5. -80°C derin dondurucu

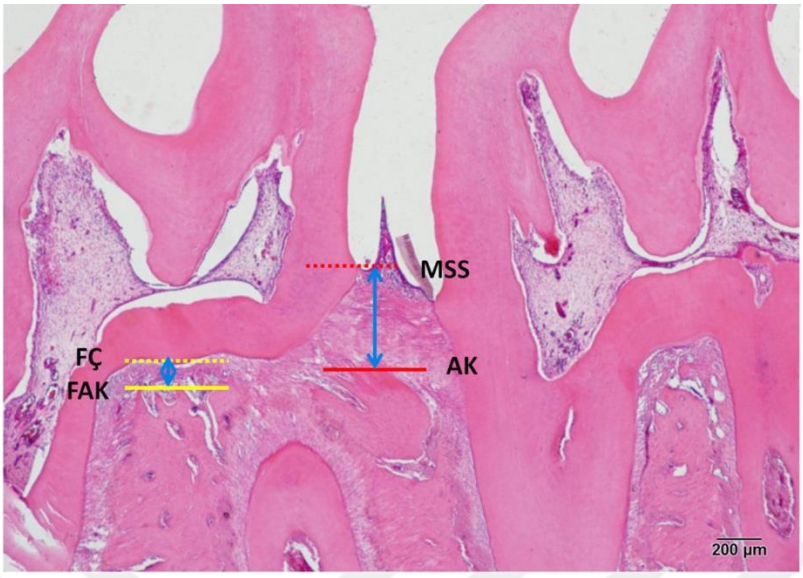


Şekil 3.6. Sağ mandibular doku örneği ve 1. molar diş etrafının ligatürlenmesi

3.6. Alveolar Kemik Kayıplarının Belirlenmesi

3.6.1 Histomorfometrik Analiz

Tüm gruplardan histolojik analizler için alınan sağ mandibula doku örnekleri 72 saat boyunca %10 nötral formaldehit içinde fikse edildi. Fikse edilen dokular histolojik incelemeye uygun hale getirmek amacıyla 15 gün boyunca %6 nitrik asit ile dekalsifiye edildi. Yeterli dekalsifikasyon sağlandıktan sonra örneklerin her biri, 3 saat süreyle sodyum bikarbonat ile nötralizasyon işlemine tabi tutuldu. Alkol ile dehidratasyonu takiben ksilen ile temizlendi ve parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklar mesio-distal yönde 5 µm kalınlığında seri olarak kesildi ve her bloktan morfometrik analizlerde kullanılmak üzere 5 kesit rastgele olarak seçildi. Seri kesitler, hematoksilen-eozin ile boyandı. Dişlerin mesio-distal taraflarındaki alveolar kemik düzeyleri mine sement sınırı (MSS) ile alveoler kemik kreti (AK) ve furkasyon çatısı (FÇ) ile Furkal alveoler kret (FAK) arasındaki mesafe olarak ölçüldü (Şekil 3.7.). Değerlendirmeler bir analiz yazılımı (Olympus DP2-BSW, Tokyo, Japonya) ile entegre edilmiş trinoküler ışık mikroskobu kullanılarak yapıldı.



ŞEKİL 3.7. Alveolar kemik kayıplarının histomorfometrik olarak ölçülmesi.

(Sarı kesikli çizgi; Furkasyon çatısı (FÇ), Sarı devamlı çizgi; Furkal alveolar kemik seviyesi (FAK) , Kırmızı kesikli çizgi; Mine sement sınırı (MSS), Kırmızı devamlı çizgi ;Alveolar kemik kreti (AK))

3.7. Histopatolojik Analizler

3.7.1. Histolojik Doku Takibi Prosedürü

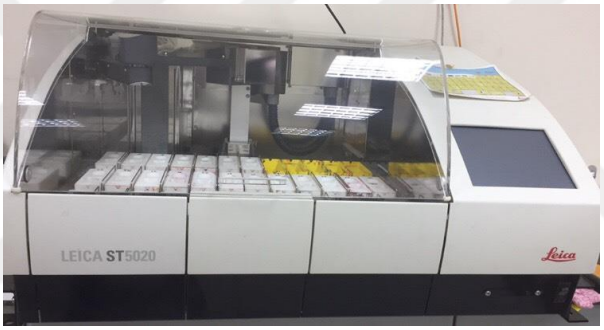
Spraque Dawley cinsi sıçanlardan çıkarılan sağ mandibular çene kemiğine histopatolojik analizlerde değerlendirilmek üzere %10'luk formalin solüsyonu kullanılarak 24 saat boyunca fiksasyon işlemi uygulandı. Fikse işlemi uygulanan çene kemiği örnekleri Morse's solusyonunda 24 saat boyunca bekletilerek dekalsifikasyon işlemi uygulandı. Bir sonraki aşamada doku örnekleri doku takip cihazında (Şekil.3.8) (ThermoScientific™ Citadel 2000, Almanya) %50, %60, %70, %80, %96, %100 (x2) lük ethanol serilerinden (Merck GmbH, Darmstadt, Germany) geçirilerek dehiratasyon ve iki seri ksilol (Merck GmbH, Darmstadt, Germany) solüsyonlarından geçirilerek şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Bir sonraki aşamada yumuşak ve sert parafinde (Merck GmbH, Darmstadt, Germany) bekletilerek parafin inkluzyonu gerçekleştirildi . Doku takibi işleminin(Tablo.3.2) ardından mandibula dokusuna ait örnekler parafin

bloklama cihazına (şekil.3.9.) (Leica EG 1150 H, Lecia Biosystems, Germany) kullanılarak doku gömme kasetlerine parafin ile bloklandı. Daha sonra parafin bloklardan rotary mikrotom (şekil.3.10.) ile 4-5 µm kalınlığında seri kesitler alınarak (Leica RM2255, Lecia Biosystems, Germany) boyama cihazı (Şekil.3.11.) (Leica ST5020, Germany) kullanılarak Hariss Hematoksilen (Merck GmbH, Germany)+Eosin G (Merck GmbH, Germany) ile boyandı.

Şekil.3.8. Doku takip cihazı foto

Şekil.3.9. Parafin bloklama

Şekil.3.10. Rotary Mikotom



Şekil.3.11. Hematoksilen-Eozin Boyama Cihazı

Tablo.3.2. Mandibula dokusuna ait doku takibi

Yapılan İşlem	Kullanılan Materyal	Zaman
Doku tespiti	%10'luk nötral formalin	36 saat
Dehidratasyon	%50'lik etanol	180 dk
	%50'lik etanol	75 dk
	%60'lık etanol	90 dk
	%70'lik etanol	90 dk
	%80'lik etanol	60 dk
	%96'lık etanol	60 dk
	%100'lük etanol	75 dk
	%100'lük etanol	75 dk
Şeffaflaştırma	Ksilen	90 dk
	Ksilen	90 dk
Parafinizasyon	Parafin	60 dk
	Parafin	210 dk
Bloklama		

3.7.2. Hematoksilen-Eozin ile Boyama Prosedürü

Lama alınan kesitler boyamadan önce hem dokudaki parafinin uzaklaştırılması hem de kesitlerin lama daha iyi adaptasyonu için formalinsiz bir ortamda 56 °C'lik etüvde (Şekil.3.12.) (Wisecube,Wertheim, Almanya) 1 saat bekletildi ve daha sonra ST5020 Multistainer Bath Array boyama cihazında boyamaya alındı (Şekil 3.10.) ve prosedürler uygulandı (Tablo 3.3)**.**

Şekil.3.12. Etüv

Tablo 3.3. Hematoksilen eozin boyama prosedürü

Yapılan İşlem	Kullanılan Materyal	Zaman
Deparafinizasyon	56 ºC'lik etüv	1 saat
	Boyama cihazı fırın	5 dk
	Ksilen	3 dk
	Ksilen	3 dk
Rehidratasyon	%100'lük etanol	1 dk
	%96'lık etanol	2 dk
	%90'lık etanol	2 dk
	%80'lik etanol	2 dk
	%70'lik etanol	2 dk
Yıkama	Musluk suyu	5 dk
	Distile su	5 dk
Boyama	Harris hematoksilen	1 dk 10 sn
Yıkama	Distile su	5 dk
Boyama	Eozin yellow	8dk 30 sn
Yıkama	Distile su	15 sn
Dehidratasyon	%70'lik etanol	20 sn
	%80'lik etanol	15 sn
	%90'lık etanol	15 sn
	%100'lük etanol	15 sn
	%100'lük etanol	15 sn
	Ksilen	15 sn
Şeffaflaştırma	Ksilen	5 dk
	Ksilen	10 dk
	Entellan	1 saat
Kapama		Kapama

3.7.3. Histopatolojik Analiz

Histomorfometrik ölçümlerin tümü 2 Histolog tarafından (TM, LT) bağımsız olarak RTEÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD Histoloji Araştırma

Laboratuarı'nda Olympus DP72 kamera ataçmanlı (Olympus, Tokyo, Japonya) Olympus trioküler BX51 TF (Olympus, Tokyo, Japonya) marka mikroskopta yapıldı.

3.7.4. İmmünohistokimyasal Analiz

Sağ mandibula dokusuna ait örnekler nötral %10'luk formalin solusyonunda (Sigma-Aldrich, Almanya) 24 saat boyunca fikse edildikden sonra Morse's solüsyonunda 24 saat boyunca bekletilerek dekalsifikasyon işlemi uygulandı. Dekalsifikasyon işleminin ardından çene kemiğine ait örnekler doku takip cihazı (şekil.3.8.) (Shendon Citadel 2000, Thermo Sceintific Inc., Almanya) kullanılarak sırası ile; artan ethanol (%50, %70, %80,%90%96,%100, %100; Merck GmbH, Darmstadt, Almanya) solüsyonunda geçirilerek dehiratasyon işlemi uygulandı. Bir sonraki aşamada doku örnekleri iki seri ksilol solusyonunda (Merck, Darmstadt, Germany) bekletilerek mordanlama işlemi uygulandı. Bir sonraki aşamada örnekleri sırası ile yumuşak ve sert parafinde gömme (Merck GmbH, Darmstadt, Almanya) işlemi uygulandı. Daha sonraki aşamada doku gömme cihazı kullanılarak (şekil 3.9.) (Leica 1125 Leica Biosystems, Almanya) sert parafin (Merck GmbH, Darmstadt, Almanya) ile doku gömme kasetlerine bloklanarak rotary mikrotomda (Leica RM2525, Leice Biosystems, Almanya) 4-5 µm kalınlığında kesitler alındı (şekil 3.10.).

Elde edilen kesitlerde RANKL primer antikoru (Abcam, United Kingdom) ve osteoptegerin (OPG) primer antikorlar (Abcam, United Kingdom) ve bunlara uyumlu sekonder antikorları içeren immunohistokimya kitlerini kullanıldı. Kesitler üretici firmanın kullanım talimatına uygun olarak immunohistokimya boyama cihazı (şekil.3.13.) (Bond Max, Fully Automated IHC and ISH ,Leica Biosystems, Australia) kullanılarak primer antikor solusyonlarında ve ardından sekonder antikor soluyonunda 60 dakika boyunca inkübe edildi. Primer ve sekonder antikor ile inkübe edilen çene kemiği dokusuna ait kesitler diaminobenzidine chromogen (DAB Choromogen, Abcam, United

Kingdom) solusyonunda inkübe edildikden sonra dokular Harris Hematoksilen ile (Merck GmbH, Darmstadt, Almanya) ile boyanarak ışık mikroskobu altında (Olympus Co., BX51, Japan) incelenerek digital fotoğraf makinası (Olympus Co., DP71, Japan) ile fotoğrafları çekildi. Her bir mandibular 1.molar diş için 5 farklı kesit ve her bir kesitte furkasyon bölgesinden 5'er farklı alanda RANKL pozitif ve OPG pozitif boyanan hücreler sayıldı. Ölçüm, gruplara kör olan iki deneyimli araştırmacı (TM, LT) tarafından önceki çalışmalara benzer şekilde yapıldı.[270, 271]

Şekil.3.13. İmmünohistokimya Boyama Cihazı

3.8. Biyokimyasal Analizler

3.8.1. Çalışmada kullanılan araç ve gereçler

Biyokimyasal analizler için RTEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarındaki cihazlar kullanılmıştır (Tablo 3.4.)

3.8.2. Kullanılan kimyasal materyaller ve marka Adları

1. Tiyokarboksilik asit (TCA) - Merck
2. Tiyobarbitürik asit (TBA) – Merck
3. Folin-ciocalteu reaktifi - Merck
4. %96'lık etil alkol – Smyras
5. 1, 1, 3, 3 tetrametoksipropan (TEP) – Fluka
6. Sodyum klorür (NaCI) - Hımedıa
7. Dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4) - Hımedıa
8. Potasyum hidrojen fosfat (KH_2PO_4) - Hımedıa
9. Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) - Hımedıa
10. Monosodyum fosfat (NaH_2PO_4) – Hımedıa
11. 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB) - Hımedıa
12. Tri sodyum sitrat - Hımedıa
13. Sodyumkarbonat (Na_2CO_3) – Sigma

Tablo.3.4. Biyokimya laboratuvarında kullanılan cihazlar ve marka adları

Cihaz Adı	Cihaz Markası
Homojenizatör	Tissue Lyser II, Qiagen
Santrifüj	Thermo Scientific, Heraeus Multifuge
Eliza Okuyucu	Thermo Scientific, Multıskan GO
Eliza Yıkayıcı	Biotek, EL × 50
Su Banyosu	Memmert WNB 14
Etüv	Memmert, UF 55
Hassas Terazi	Acculab
Manyetik Karıştırıcı	WiseStir, MSH 20 A
Otomatik pipet	Brand

3.8.3. Doku homojenatlarının hazırlanması

Sol mandibula dokusuna ait örnekler kanın uzaklaştırılması amacı ile fosfat tamponu uygulanarak -80°C derin dondurucuda saklandı. Homojenizasyon işleminin yapılabilmesi için -80°C deki derin dondurucudan çıkarılan doku örnekleri işlem boyunca buz kütlesi içerisinde muhafaza edildi. Homojenizasyonu için soğuk PBS (Phosphate buffered saline, pH:7.4) ile yıkanarak kandan uzaklaştırıldı. PBS için 0.435 gr Na_2HPO_4 ve 0,302 gr NaH_2PO_4 kimyasal maddeleri hassas tartıda ölçüldü. Tartılan bu kimyasallar distile su ile 500 ml'ye tamamlandı ve pH 7,4'e ayarlandı. 0.5 gr mandibula doku örnekleri hassas terazi ile ölçülerek eppendorf tüplerin içine kondu ve üzerine ölçülen doku ağırlığının iki katı olacak şekilde PBS ilave edildi. Eppendorf tüp kapakları meydana gelebilecek açılmaya karşı parafilm ile kaplandı. Doku örnekleri tekrardan buz kütlesinin içerisine konuldu. Bütün örnekler homojenizatörle (Tissue Lyser II, Qiagen, Almanya), 30 hertz frekansta 5 dk boyunca homojenize edildi. Tam homojenize olmayan doku örneklerine aynı koşullar altında bir kere daha homojenizasyon işlemi uygulandı.

Doku homojenatları, 4°C'de 15 dk boyunca 3.000 g'de santrifüjlendi (Thermo Scientific, Heraeus Multifuge, Waltham, Massachusetts, ABD). Elde edilen süpernatant kısımları, MDA, GSH, TOD, TAOK, IL-1β, IL-10, MMP-8 ve MMP-9 seviyelerini analiz etmek için kullanıldı. Tüm sonuçlar gr dokuya bölünerek ifade edildi.

3.8.4. Doku İnflamatuar Sitokin ve Enzim Düzeylerinin Belirlenmesi

Mandibula dokularından elde edilen süpernatantlarda IL-10, IL-1β, MMP-8 ve MMP-9 seviyeleri, piyasadaki rat spesifik ELISA kitleriyle ölçüldü (şekil.3.14.). Kitle çalışırken yıkama işlemleri için elisa yıkayıcı cihaz (Biotek, ELx50, Winooski, Vermont, ABD) (şekil.3.15.) ve analiz etmek için elisa okuyucu cihaz (Thermo Scientific, Multıskan GO, Waltham, Massachusetts, ABD) kullanıldı (şekil.3.16.). Sonuçlar IL-lβ, IL-10 için pg/ml ve MMP-8, MMP-9 için ng/ml olarak ifade edildi.

3.8.4.1. IL-lβ, IL-10 Düzeylerinin ELISA Kitiyle Analiz Edilmesi

IL-lβ (katalog no: E-EL-R0012), IL-10 (katalog no: E-EL-R0016) Elabscience marka (Houston, Texas, ABD) ve düzeylerinin ölçümü için piyasadaki rat spesifik ELISA kiti kullanıldı ve kitin talimatlarına uygun olarak çalışıldı.

Kitin Prensibi: Bu ELISA kitinde, Sandwich-ELISA prensibi kullanılır. Bu kitten sağlanan mikro ELISA plakası, hangi marker incelenecekse ona özel bir antikor ile kaplıdır. Mikro ELISA plaka kuyucuklarına numuneler eklenir ve spesifik antikor ile birleştirilir. Bir dizi prosedürden sonra incelenen marker mavi renkte görünecektir. Enzim-substrat reaksiyonu durdurma (stop) çözeltisinin eklenmesiyle renk sarıya döner. Optik yoğunluk (OD), 450 nm ± 2 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür. OD değeri, rat IL-lβ ve IL-10 konsantrasyonu ile orantılıdır. Numunelerin OD'si standart eğri ile karşılaştırılarak rat IL-lβ ve IL-10 konsantrasyonları hesaplanır. Hesaplanan değer oranlanarak IL-lβ/ IL-10 değeri bulunur.

3.8.4.1.1.Kitin Çalışma Prosedürü

IL-lβ ve IL-10 analizi benzer çalışma prosedürleri uygulanarak yapıldı.

1. Plaka kuyucuklarına 100 µL doku örneği eklendi ve 37°C'de 90 dk inkübe edildi.

2. Sıvı uzaklaştırıldı ve hemen her bir kuyucuğa 100 µL biyotinlenmiş saptama antikoru eklendi. 37°C'de 60 dk inkübe edildi.

3. Plaka 3 kez aspire edildi ve yıkandı.

4. 100 µL HRP konjugatı eklendi ve 37 ° C'de 30 dk inkübe edildi. Plaka 5 kez aspire edildi ve yıkandı.

5. 90 µL substrat reaktifi eklendi ve 37°C'de 15 dk inkübe edildi.

6. 50 µL stop çözeltisi eklendi.

7. Plaka hemen 450 nm'de okundu.

3.8.4.2. MMP-8 Düzeylerinin ELİSA Kitiyle Analiz Edilmesi

Doku MMP-8 düzeylerinin belirlenebilmesi için piyasadaki rat spesifik USCN marka (Wuhan, Çin) kit kullanıldı ve kitin talimatlarına uygun olarak çalışıldı. (katalog no: SEA103Ra)

Kitin Prensibi: Bu ELISA kitinde, Sandwich-ELISA prensibi kullanılır ve numunedeki rat MMP-8'un kantitatif seviyesi ölçülür. Bu kitte sağlanan mikrotitre plakası, Matrix Metalloproteinase 8'e (MMP8) özgü bir antikor ile önceden kaplanmıştır. Numuneler Matrix Metalloproteinase 8'e (MMP8) özgü bir biyotin-konjuge antikor ile uygun mikrotitre plaka oyuklarına eklenir ve MMP-8'a spesifik antikor ile birleştirilir. Bir dizi prosedürden sonra reaksiyon mavi renkte görünecektir. Reaksiyon, stop çözeltisinin eklenmesiyle sonlandırılır ve renk değişimi 450 nm ± 10 nm dalga boyunda ölçülür.

Reaktiflerin Hazırlanması

Yıkama tamponu: 400 ml yıkama tamponu hazırlamak için 20 ml yıkama tamponu konsantresi distile suyla seyreltildi.

Standardın seyreltilmesi: Her tüpte 50 µl standart seyreltme ve 5. tüpe 100 µl standart (36 ng/ml) pipetlendi. 5. tüpten 100 µl kadar 4. tüpe alındı. 4.tüpten 50 µl 3. tüpe pipetlendi ve katalogdaki gibi seyreltme serisi oluşturuldu. Seyreltilmemiş standart, 36 ng/ml olarak, numune dilüsyonu ise (boş kuyu) 0 ng / ml olarak kabul edildi.

3.8.4.2.1. Kitin Çalışma Prosedürü

Tüm reaktifler, standartlar ve örnekler yukarıda belirtildiği gibi hazırlandı ve kullanılacak kuyucuk sayısı ile boş bırakılacak kuyucuk belirlendi.

1.Standart kuyucuğa standarttan 50 µl, numune kuyucuğuna 40 µl numune dilüsyonu pipetlendi ve ardından test edilecek numuneler 10 µl kadar eklendi.

2.Numune kuyucuklara pipetlendikten sonra, kuyucuk duvarına mümkün olduğunca dokunmadan yavaşça karıştırıldı.

3.Yapışkan bantla kapatıldı ve 37°C'de 30 dk inkübe edildi.

4.Yıkama solüsyonu 20 kat distile su ile seyreltildi.

5.Yapışkan şerit açıldı ve sıvı uzaklaştırıldı. Yıkama tamponu her kuyucuğa pipetlendi. 30 sn sonra tekrarlanacak şekilde 5 kez bu işlem yapıldı.

6.Boş kuyucuk hariç her kuyuya HRP-konjugat reaktifinden 50 µl kadar pipetlendi.

7.Her bir kuyucuğa 50 µl kromojen solüsyonu A ve 50 µl kromojen solüsyonu B pipetlendi. 37°C'de 15 dk ışık korumasından kaçınıldı.

8. Reaksiyonu durdurmak için her bir kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklendi. Stop reaksiyonu maviden sarıya dönen renk değişikliği şeklinde izlendi.

9.Stop solüsyonunun pipetlenmesinden sonra 15 dk içinde 450 nm'de absorbansı okundu.

3.8.4.3 MMP-9 Düzeylerinin ELISA Kitiyle Analiz Edilmesi

Doku MMP-9 düzeylerinin ölçümü için piyasadaki rat spesifik Sunredbio marka (Hangzhou, Çin) ELISA kiti kullanıldı ve kitin talimatlarına uygun olarak çalışıldı (katalog no: SG-20412, 2011-11-0322).

Kitin Prensibi: Bu ELISA kitinde, Sandwich-ELISA prensibi kullanılır ve numunedeki rat MMP-9'un kantitatif seviyesi ölçülür. Bu kitten sağlanan mikrotitre plakası MMP-9 antikoru ile kaplıdır. Kuyucuklara numuneler eklenir ve MMP-9'a spesifik antikor ile birleştirilir. Bir dizi prosedürden sonra reaksiyon mavi renkte görünecektir. Reaksiyon, stop çözeltisinin eklenmesiyle sonlandırılır ve renk değişimi 450 nm dalga boyunda ölçülür.

Reaktiflerin Hazırlanması

Yıkama tamponu: 400 ml yıkama tamponu hazırlamak için 20 ml yıkama tamponu konsantresi distile suyla seyreltildi.

Standardın seyreltilmesi: Her tüpte 50 µl standart seyreltme ve 5. tüpe 100 µl standart (36 ng/ml) pipetlendi. 5. tüpten 100 µl kadar 4. tüpe alındı. 4.tüpten 50 µl 3. tüpe pipetlendi ve katalogdaki gibi seyreltme serisi oluşturuldu. Seyreltilmemiş standart, 36 ng/ml olarak, numune dilüsyonu ise (boş kuyu) 0 ng / ml olarak kabul edildi.

3.8.4.3.1. Kitin Çalışma Prosedürü

1. Tüm reaktifler, standartlar ve örnekler yukarıda belirtildiği gibi hazırlandı ve kullanılacak kuyucuk sayısı ile boş bırakılacak kuyucuk belirlendi.

2. Standart kuyucuğa standarttan 50 µl, numune kuyucuğuna 40 µl numune dilüsyonu pipetlendi ve ardından test edilecek numuneler 10 µl kadar eklendi.

3. Numune kuyucuklara pipetlendikten sonra, kuyucuk duvarına mümkün olduğunca dokunmadan yavaşça karıştırıldı.

4. Yapışkan bantla kapatıldı ve 37°C'de 30 dk inkübe edildi.

5. Yıkama solüsyonu 20 kat distile su ile seyreltildi.

6. Yapışkan şerit açıldı ve sıvı uzaklaştırıldı. Yıkama tamponu her kuyucuğa pipetlendi. 30 sn sonra tekrarlanacak şekilde 5 kez bu işlem yapıldı.

7. Boş kuyucuk hariç her kuyuya HRP-konjugat reaktifinden 50 µl kadar pipetlendi.

8. Her bir kuyucuğa 50 µl kromojen solüsyonu A ve 50 µl kromojen solüsyonu B pipetlendi. 37°C'de 15 dk ışık korumasından kaçınıldı.

9. Reaksiyonu durdurmak için her bir kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklendi. Stop reaksiyonu maviden sarıya dönen renk değişikliği şeklinde izlendi.

10. Stop solüsyonunun pipetlenmesinden sonra 15 dk içinde 450 nm'de absorbansı okundu.

3.8.5. Doku Oksidan-Antioksidan Parametrelerinin İncelenmesi

3.8.5.1. Doku Malondialdehit Düzeylerinin Belirlenmesi

Deneyin prensibi: MDA lipit peroksidayon reaksiyonunun son ürünüdür. MDA miktarının belirlenmesi, Draper ve Hadley'in belirlediği yönteme göre yapıldı. MDA'nın TBA ile reaksiyonu sonucu oluşan pembe renkli kompleksin absorbansının 532-535 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır.[272]

3.8.5.1.1. Kullanılan çözeltilerin hazırlanışı

1. 10 g TCA deiyonize su ile çözülerek 100 ml'ye tamamlandı.

2. 0.67 g TBA deiyonize su ile çözülerek 100 ml'ye tamamlandı.

3.Standartları hazırlamak için %40'lık etanol hazırlandı. 25 µL TEP alınarak %40'lık etanol ile 25 ml'ye tamamlanarak standartlar 41,8 - 20,9 - 10,47 - 5,22 - 2,43 µmol/L şeklinde hazırlandı.

3.8.5.1.1.1. Deneyin yapılışı

Sol mandibula dokuları homojenize edildikten sonra süpernatanttan 50 µL alındı ve üzerine %10'luk 50 µL TCA eklendi. Vorteks edilip 15 dk 94°C lik su banyosunda bekletildi. Daha sonra su banyosundan alınan tüpler soğutuldu. 4600 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüjden sonra süpernatanttan 20 µL alınarak temiz eppendorf tüpüne aktarıldı ve %67'lik TBA çözeltisinden 10 µL eklenerek vortekslendi. 94°C su banyosunda 15 dk boyunca tekrar bekletildi. Numuneler soğutulup plate kuyucuklarına pipetlenerek spektrofotometrede 532 nm'de pembe renkli kompleks ürünün absorbansı ölçüldü. Standart grafikten hesaplama yapıldı ve sonuçlar nmol/gr doku şeklinde ifade edildi.

3.8.5.2. Doku Glutatyon düzeylerinin belirlenmesi

Deneyin prensibi: Sol mandibula dokularının glutatyon düzeyinin ölçülmesinde Ellman yöntemi uygulandı. Bu yöntemin prensibi; mandibula doku homojenatındaki serbest sülfidril gruplarının, Ellman reaktifi olarak da bilinen DTNB ile oluşturduğu sarı rengi 412 nm'de spektrofotometrik olarak ölçerek sonucu belirlemektir.[273]

3.8.5.2.1. Kullanılan çözeltilerin hazırlanışı

1. Na_2HPO_4 için 4,25 gr Na_2HPO_4 deiyonize suda çözülerek 100 ml'ye tamamlandı.
2. Ellman ayıracı: 0,004 gr DTNB tartılarak %1'lik sodyum sitrat çözeltisiyle 10 ml'ye tamamlandı.
3. Standartlar stok glutatyondan; 100 - 80 - 60 - 40 - 20 - 10 - 5 µmol/L şeklinde hazırlandı.

3.8.5.2.2. Deneyin yapılışı

Mandibula dokuları homojenize edildikten sonra eppendorf tüpün içine süpernatanttan 50 µL alındı, 200 µL 3M Na_2HPO_4 ve 50 µL Ellman reaktifi eklendi. Daha sonra vortekslenerek her bir örnekten 250 µl kadar plate kuyucuklarına pipetlendi. Oluşturulan sarı renkli kompleksin absorbansları, bir spektrofotometre cihazında 412 nm'de okutuldu. Standart grafikten hesaplama yapıldı ve sonuçlar nmol/gr doku şeklinde ifade edildi.

3.8.5.3 Doku Total Oksidan Düzeylerinin Belirlenmesi

Kitin Prensibi: Mandibula dokusundan elde edilen süpernatantların TOD seviyeleri, Erel tarafından geliştirilen ve ilgili moleküllerin total miktarlarını bir bütün halinde ölçmeye olanak sağlayan, ışığın absorblanması esasına göre çalışan otomatik bir yöntem ile hesaplandı.[166] Süpernatantlarda bulunan oksidan moleküller, ferröz iyon-o-dianisidin kompleksini ferrik iyona oksidayonunu sağlar. Oksidasyon reaksiyonu,

ortamda bol miktarda bulunan gliserol molekülleri tarafından desteklenir. Ferrik iyon, asidik bir ortamda *xylenol orange* ile renkli bir kompleks meydana getirir. Doku örneğinde bulunan total oksidan molekül miktarıyla ilgili olan renk yoğunluğu spektrofotometrik olarak belirlenir. Bu çalışmada piyasada bulunan Rel Assay Diagnostics markalı TOD ticari kitleri (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep, Türkiye) kullanıldı. Kit kataloğunda belirtilen prosedürlere uygun olarak çalışıldı.

3.8.5.3.1. Kitin Çalışma Prosedürü

45 µl doku örneğinin bulunduğu küvete ilk olarak 300 ul reaktif 1 solüsyonundan eklendi, 30 saniye bekleme süresini takiben 530 nm'de birinci absorbansı tespit edildi.Takiben mevcut küvete 15 ul reaktif 2 solusyonu ilave edildi. Oda şartlarında 10 dakika beklendikten sonra 530 nm'de 2. kez absorbansı tespit edildi. Test, hidrojen peroksit ile kalibre edildi ve sonuçlar µmol H_2O_2 eşdeğeri/gr protein olarak ifade edildi.

3.8.5.4. Doku Total Antioksidan Düzeylerinin Belirlenmesi

Kitin Prensibi: Mandibula dokusundan elde edilen süpernatantların TAOK seviyeleri, Erel tarafından geliştirilen ve ilgili moleküllerin total miktarlarını bir bütün halinde ölçmeye olanak sağlayan , ışığın absorblanması esasına göre çalışan otomatik bir yöntem ile hesaplandı.[170] Doku örneğinde bulunan antioksidanlar, koyu mavi-yeşil renkli 2,2′-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) radikalini renksiz ABTS formuna indirgemekte yani renk oluşumunu baskılamaktadır. Doku örneğinde bulunan antioksidan moleküllerin toplam miktarıyla ilişkili olan absorbans değişikliği spektrofotometrik olarak ölçülür.

Bu çalışmada piyasada bulunan Rel Assay Diagnostics markalı TAOK ticari kitleri (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep, Türkiye) kullanıldı. Kit kataloglarında belirtilen prosedürlere uygun olarak çalışıldı.

3.8.5.4.1. Kitin Çalışma Prosedürü

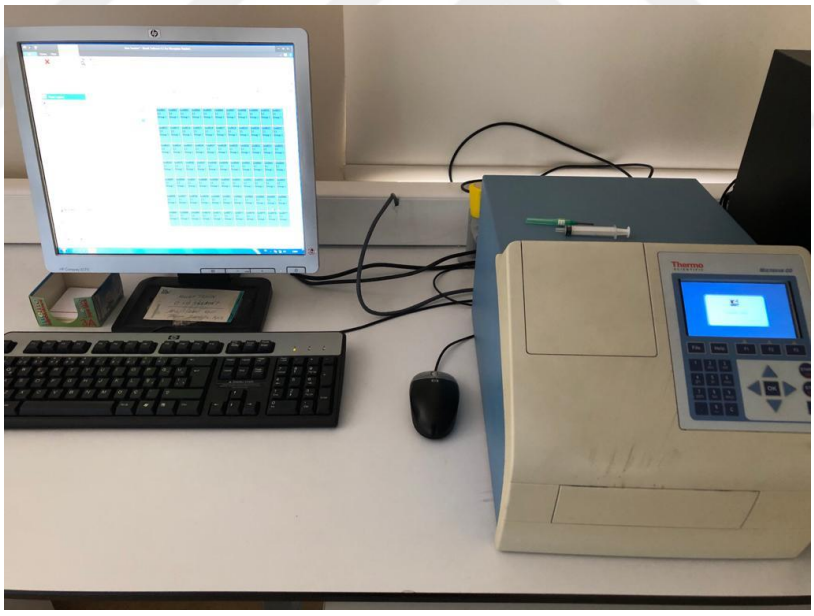
18 ul mandibula doku örneğinin bulunduğu küvete öncelikle 300 ul reaktif 1 solüsyonundan eklendi 30 saniye bekleme süresinin ardından 660 nm'de ilk absorplanma değeri tespit edildi. Ardından mevcut küvete 45 ul reaktif 2 solüsyonu eklendi oda sıcaklığında 10 dakika beklenerek 660 nm'de 2.kez absorblanma değeri tespit edildi. Test, bir E vitamini analoğu olan Trolox Eşdeğeri ile kalibre edildi ve sonuçlar µmol Trolox eşdeğeri/gr protein olarak ifade edildi.

3.8.5.5. Oksidatif Stres İndeksinin Hesaplanması

TOD/TAOK yüzde oranı olan OSİ=[(TOD (µmol H_2O_2 eşdeğeri/L)/TAOK (µmol Trolox eşdeğeri/L)] olarak hesaplandı.[176]

Şekil.3.14. Süpernatantların ELISA kiti ile incelenmesi

Şekil.3.15. Eliza yıkayıcı cihaz



Şekil.3.16. Eliza okuyucu cihaz

3.8.6. Kortikosteron (CORT) Düzeylerinin Elisa Kitiyle Belirlenmesi

Serum corticosterone seviyelerinin belirlenebilmesi için piyasada yer alan Elabscience marka (Houston, Texas, ABD) CORT (katalog no: E-EL-0160) rat spesifik ELİSA kiti kullanıldı ve kitin çalışma talimatına uygun olarak çalışıldı.

Kitin Prensibi: Bu ELISA kiti, Yarışmacı-ELISA prensibi ile kullanır. Bu kitte sağlanan mikro ELISA plakası, CORT ile önceden kaplanmıştır. Mikro ELISA plaka kuyucuklarına numuneler eklenir ve spesifik antikor ile birleştirilir. Bir dizi prosedürden sonra incelenen marker mavi renkte görünecektir. Enzim-substrat reaksiyonu durdurma (stop) çözeltisinin eklenmesiyle renk sarıya döner. Optik yoğunluk (OD), 450 nm ± 2 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür. OD değeri, rat CORT konsantrasyonu ile orantılıdır. Numunelerin OD'si standart eğri ile karşılaştırılarak rat serum CORT değerleri hesaplanır.

3.8.6.1. Kitin Çalışma Prosedürü

CORT çalışma prosedürleri uygulanarak yapıldı.

1. Plaka kuyucuklarına 100 µL doku örneği eklendi ve 37°C'de 90 dk inkübe edildi.

2. Sıvı uzaklaştırıldı ve hemen her bir kuyucuğa 100 µL biyotinlenmiş saptama antikoru eklendi. 37°C'de 60 dk inkübe edildi.

3. Plaka 3 kez aspire edildi ve yıkandı.

4. 100 µL HRP konjugatı eklendi ve 37 ° C'de 30 dk inkübe edildi. Plaka 5 kez aspire edildi ve yıkandı.

5. 90 µL substrat reaktifi eklendi ve 37°C'de 15 dk inkübe edildi.

6. 50 µL stop çözeltisi eklendi.

7. Plaka hemen 450 nm'de okundu.

3.9.Fizyolojik Analizler

3.9.1.Açık alan testi (OFT)

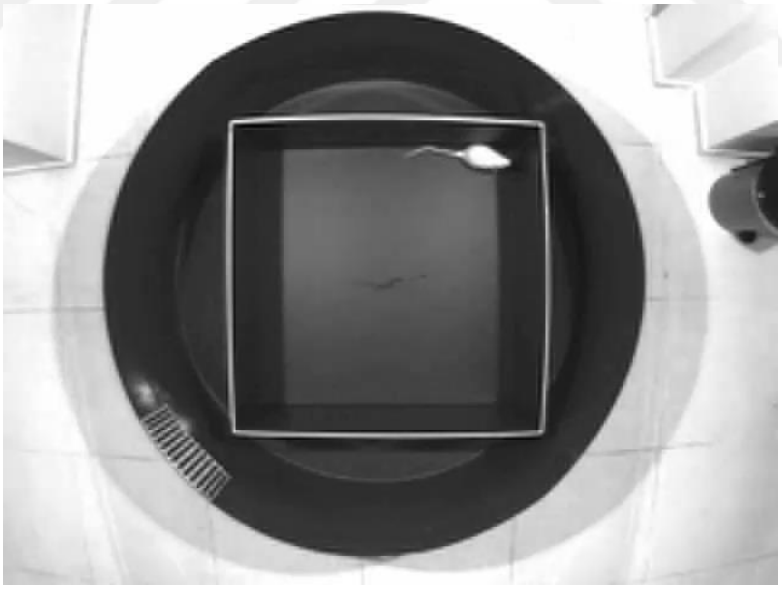
Hayvanların kaçışının önlendiği, yeni bir açık alana yerleştirildiklerindeki kaygı benzeri davranışsal tepkilerini ölçmek için tasarlanmış bir davranış testidir. Kemirgenler genellikle kapalı alanlarda vakit geçirmeyi tercih ederler ve bu nedenle açık alanın çevresini merkeze kıyasla keşfetmek için daha fazla zaman harcarlar. Mevcut çalışmada kullanılan deney protokolü başka bir çalışmadan[274] modifiye edilmiştir. Kısaca; test arenası, 90 x 90 cm ebatlarında duvarları 40 cm yüksekliğinde siyah pleksiglas malzemeden yapılmıştır.(Şekil .3.17.) Tavana tüm alanı eşit oranda aydınlatan 50W halojen ampul ve hayvan davranışlarını izleme yazılım sistemine (ANY-maze, Dublin/ İRLANDA) (Şekil.3.18.) ait tepe kamera sistemi yerleştirilmiştir. Test alanı yazılım ekranında 10 cm'lik küçük karelere bölünerek merkezi alan ve kenar bölgeler belirlendi. Denekler çalışma başlamadan 1 hafta önceden başlayarak her gün ilgili restraint stresin uygulandığı zaman aralıklarında davranış testlerinin yapılacağı laboratuvara getirilerek adaptasyonları sağlandı. Deneyin 42.gününde açık alan testi gerçekleştirildi .Test tek bir oturumdan oluşmakta olup test süresi her bir hayvan için 5 dakika olarak belirlendi. Denekler önceki hayvanın koku, idrar vb. kalıntılarından etkilenmemesi için platform %70 etanol çözeltisi ile temizlendi. Uygulama aşamasında sıçanlar test alanının ortasına bırakılarak yazılım aracılığıyla lokomotor aktivite ve anksiyete benzeri diğer davranışları kaydedildi. Bu amaçla, test bitiminde kat edilen toplam mesafe, ortalama hız, total immobilizasyon zamanı, merkez ve kenar alanlarda geçirilen süre, merkeze giriş sayısı, tımarlanma ve şahlanma davranışı kaydedildi. İlave olarak, anksiyete benzeri davranışın önemli bir belirteci olan defekasyon bolus sayısı da kayıt altına alındı.

Açık alan testi, her zaman ratın alanın merkezine yerleştirilmesiyle başlar, alıştığı çevrenin aksine geniş ve açık bir alana yerleştirilen rat merkezde durmaktan kaçınacak,

anksiyetisinin artışıyla birlikte kenar alanlara doğru hareket edecektir. Anksiyete artışı periferik bölgelerde geçirilen süre artışı ile sonuçlanacaktır. Ratın bu davranışı 'thigmotaksis' olarak adlandırılır. Anksiyetesi azalan ratlar ise daha çok merkez bölgede konumlanacak ve merkeze giriş sayıları ve merkezde geçirdikleri sürede artış meydana gelecektir.[275]

Açık alan testinde anksiyete düzeyinin belirlenmesi ile ilgili çok sayıda farklı davranış (iki ayağı üzerine kalkma, kaşınma, gezinme v.b.) ve parametre bulunmaktadır. Bu davranış biçimlerinden biri olan iki ayağı üzerine ya da şaha kalkma olarak adlandırılan davranış, ratın çevreye olan merak duygusunun anksiyete duygusuna baskın gelmesiyle ortaya çıkar. Rat bu davranışı kenar desteği alarak ya da almayarak sergileyebilir.[276] Açık alan testi sırasında meydana gelen kaşınma hareketi ise stereotipik aktivite (kendine özgü tekrarlayan davranışlar) ile ilgilidir. Artmış stereotipik aktivite anksiyete hakkında bilgi verebilir ancak doğrudan anksiyeti değerlendirmek için kullanılmaz.[277] Alıştığı koşulların aksine bir ortama yerleştirilen rat anksiyete artışı ile birlikte daha az hareket eder ve defekasyon davranışlarında artış meydana gelir.[275, 278]

Şekil.3.17. OFT protokülünün uygulandığı pleksiglass kabin



Şekil.3.18. Anymaze programı

3.10. İstatiksel Analiz

Kantitatif analizler ile elde edilen veriler istatistiksel olarak SPSS 20.0 (IBM Corp, NJ, A.B.D.) istatistik programı kullanılarak verilerin normal dağılıma uygunluğunu

değerlendirmede Shapiro-Wilk testi, Q-Q plot, Skewness-Kurtosis, Levene's testleri uygulanarak değerlendilirildi. Değerlendirme sonucunda veriler aritmetik ortalama ve standart sapma şeklinde hesaplanarak One-Way ANOVA ve bunu takiben gruplar arasındaki farkları değerlendirmek için Tukey HSD testi ile analiz edildi. İstatistiksel anlamlılık için tip-1 hata düzeyi %5 olarak kabul edildi.

4.BULGULAR

4.1.Morfometrik Bulgular (Alveolar Kemik Kayıpları)

Histolojik kesitler üzerinde yapılan morfometrik ölçüm bulguları gruplar arasındaki değişimler açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar göstermektedir. Alveolar kemik kaybı (MSS-AK) açısından karşılaştırıldığında Dp (p=0,00), S-Dp (p=0,00), S-Dp-Mel (p=0,00) grupları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek tespit edildi (p<0.05). Dp (p=0,00), S-Dp (p=0,00), S-Dp-Mel (p=0,00) grupları S grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek tespit edildi (p<0.05). Dp grubu kontrol (p=0,00), S (p=0,00), S-Mel (p=0,00), S-Dp-Mel (p=0,00) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek tespit edilirken, S-Dp (p=0,00) grubu Dp grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek tespit edildi (p<0.05). S-Dp grubu diğer tüm gruplara (p=0,00) göre daha fazla alveolar kemik kaybı gösterip, istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulundu (p<0.05). Dp (p=0,00), S-Dp (p=0,00), S-Dp-Mel (p=0,00) grupları S-Mel grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek tespit edildi (p<0.05). S-Mel grubunda S (p=0,854) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde hafif bir düşüş tespit edildi (p>0.05). S-Dp-Mel grubu kontrol (p=0,00), S (p=0,00), S-Mel (p=0,00) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek tespit edilirken melatonin tedavisinin alveolar kemik kaybını kısıtlaması ile Dp (p=0,00), S-Dp (p=0,00) grupları S-DP-Mel grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulundu (p<0.05), (Şekil.4.1.), (Tablo.4.1.).

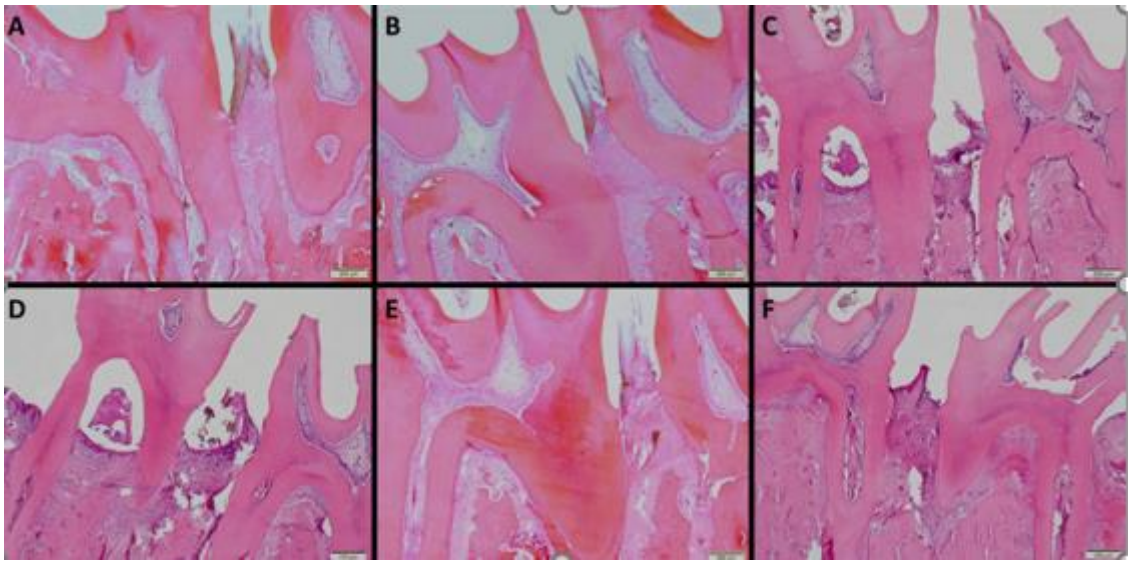
Aynı histolojik kesitler alveolar kemik kaybı (FÇ-FAK) açısından değerlendirildiğinde S (p=0,04), Dp (p=0,00), S-Dp (p=0,00), S-Dp-Mel (p=0,00) grupları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek tespit edildi (p<0.05). Dp (p=0,00), S-Dp (p=0,00), S-Dp-Mel (p=0,00) grupları S grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek tespit edildi (p<0.05). S grubu hem kontrol

(p=0,04) hem de S-Mel (p=0,023) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek tespit edildi (p<0.05). Dp grubu kontrol (p=0,00), S (p=0,00), S-Mel (p=0,00), S-Dp-Mel (p=0,00) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek tespit edildi (p<0.05). S-Dp grubu diğer tüm gruplara (p=0,00) göre daha fazla alveolar kemik kaybı gösterip, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek tespit edildi (p<0.05). S-Mel grubu S (p=0,023) ve S-Dp-Mel (p=0,00) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük tespit edildi. (p<0.05). S-Dp-Mel grubu kontrol (p=0,00), S (p=0,00), S-Mel (p=0,00) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek iken, Dp (p=0,00), S-Dp (p=0,00) grupları S-Dp-Mel grubuna göre melatonin tedavisinin alveolar kemik kaybını kısıtlaması ile istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek tespit edildi (p<0.05) ,(Şekil.4.1.), (Tablo.4.1.).

Tablo.4.1. Alveoler kemik kayıplarının gruplar arasında karşılaştırılması

Parametre	Kontrol	S	Dp	S-Dp	S-Mel	S-DP-Mel
MSS-AK	368,4125 ± 18,82769$^{ł,\#,¶}$	429,9163 ± 31,90078$^{ł,\#,¶}$	876,3450 ± 40,72113$^{*,ǂ,\#,£,¶}$	1108,2163 ± 140,93141$^{*,ǂ,ł,£,¶}$	393,1425 ± 20,97005$^{ł,\#,¶}$	726,7863 ± 29,54548$^{*,ǂ,ł,\#,£}$
FÇ-FAK	66,1050 ± 6,26029$^{ǂ,ł,\#,¶}$	102,7938 ± 9,68327$^{*,ł,\#,£,¶}$	379,1288 ± 20,83393$^{*,ǂ,\#,£,¶}$	425,6850 ± 27,62979$^{*,ǂ,ł,£,¶}$	72,0650 ± 7,14060$^{ǂ,ł,\#,¶}$	335,0588 ± 26,62980$^{*,ǂ,ł,\#,£}$

[S;Restraint stres, **Dp**; Deneysel periodontitis, **Mel**; melatonin, , **MSS-AK;** mine sement sınırı-alveolar kemik kreti, **FÇ-FAK;**furkasyon çatısı- furkal alveolar kemik kreti. Değerler ortalama ± SS olarak ifade edildi $^{*,ǂ,‖,\#,£,¶}$aynı satırdaki dipnot harfler gruplar arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları gösterir. Tek yönlü ANOVA ve Tukey testi yapıldı. ***** işareti p<0.05 kontrol, ǂ işareti p<0.05 S, ‖ işareti p<0.05 Dp , # işareti p<0.05 S-Dp ,**£** işareti p<0.05 S-Mel **,** ¶ işareti p<0.05 S-Dp-Mel gruplarına göre anlamlı sonuçları temsil etmektedir.]



Şekil.4.1. Alveolar kemik kayıplarının histolojik kesitler üzerinde değerlendirilmesi [Hematoksilen eozin ile kesitler üzerinde yapılan boyamada A;kontrol, B;S, C;Dp, D;S-Dp, E;S-Mel, F;S-Dp-Mel gruplarını temsil etmektedir. **(**S;Restraint stres, Dp; Deneysel periodontitis, Mel; melatonin)]

4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular

4.2.1. Doku RANKL, OPG, RANKL/OPG Bulguları

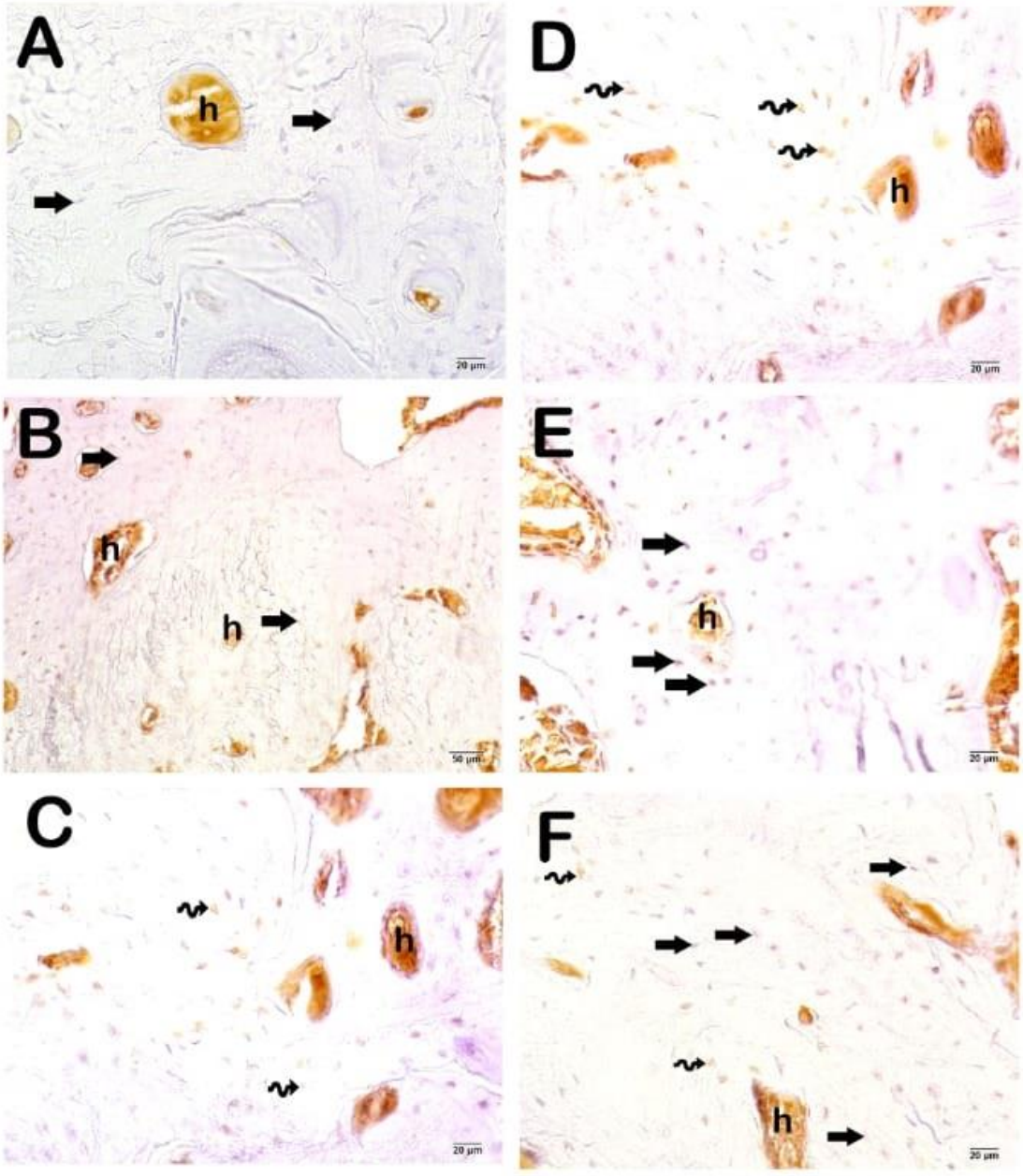
Histolojik kesitler üzerinde antikorlar ile inkübe edilerek yapılan boyama işlemi interradiküler alanlarda RANKL ve OPG pozitif hücreleri belirlemiştir. (Şekil.4.2., Şekil.4.3.) Gruplar birim alana düşen RANKL pozitif hücre sayısı açısından değerlendirildiğinde gruplar arasında istatiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunmuştur. Dp (p=0,00), S-Dp (p=0,00), S-Dp-Mel (p=0,00) grupları hem kontrol hem de S gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek tespit edildi ($p<0.05$). S-Dp (p=0,00) grubu Dp grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek tespit edilirken, Dp grubu kalan diğer gruplara (p=0,00) göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek tespit edildi ($p<0.05$). S- Dp grubu diğer tüm gruplara (p=0,00) göre anlamlı düzeyde yüksek tespit edildi ($p<0.05$). Dp (p=0,00), S-Dp (p=0,00), S-Dp-Mel (p=0,00) grupları S-Mel grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek tespit edildi ($p<0.05$). S-Dp-Mel grubu kontrol (p=0,00), S (p=0,00), S-Mel (p=0,00) gruplarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek tespit edilirken, Dp (p=0,00) ve

S-Dp (p=0,00) gruplarından melatonin tedavisinin alveolar kemik kaybını kısıtlaması ile istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük tespit edildi (p<0.05), (Şekil.4.4.).

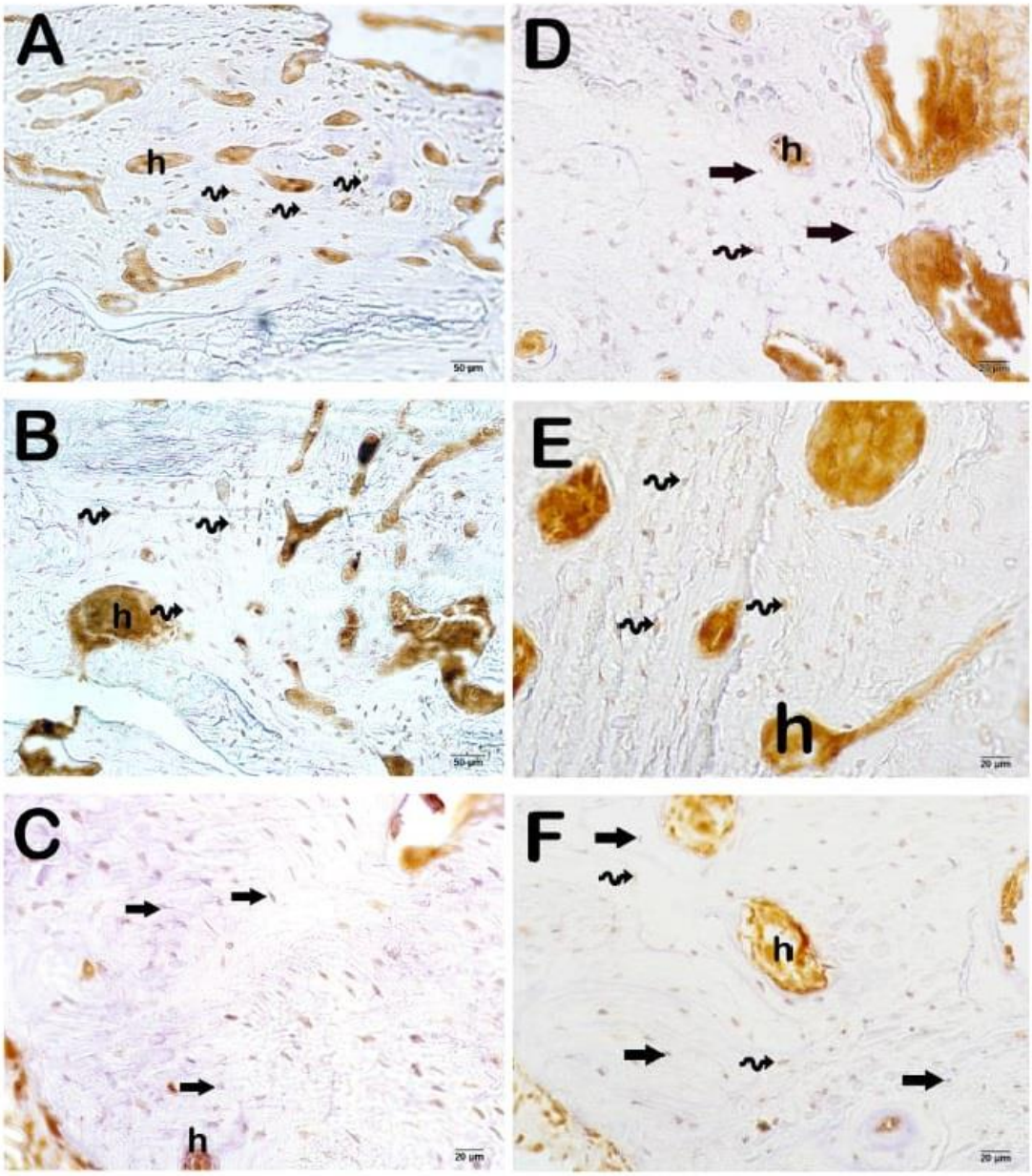
Gruplar histolojik kesitler üzerinde birim alana düşen OPG pozitif hücre sayısı açısından değerlendirildiğinde; kontrol grubu Dp (p=0,00), S-Dp (p=0,00), S-Dp-Mel (p=0,00) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek tespit edildi (p<0.05). S grubu Dp (p=0,00), S-Dp (p=0,00), S-Dp-Mel (p=0,04) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek tespit edildi (p<0.05). Kontrol (p=0,00), S (p=0,00), S-Mel (p=0,00) grupları Dp grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek tespit edildi (p<0.05). S-Dp grubunda Dp (p=0,085) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde hafif bir düşüş tespit edildi (p>0.05). S-Dp grubu kontrol (p=0,00), S (p=0,00), S-Mel (p=0,00) ve S-Dp-Mel (p=0,01) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük tespit edildi (p<0.05). S-Mel grubu Dp (p=0,00), S-Dp (p=0,00), S-Dp-Mel (p=0,00) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek tespit edildi (p<0.05). S-Dp-Mel grubu kontrol (p=0,00), S (p=0,04), S-Mel (p=0,00) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük tespit edilirken , S-Dp (p=0,01) grubuna göre melatonin tedavisinin alveolar kemik kaybını kısıtlaması ile istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek tespit edildi,(p<0.05), (Şekil.4.4.).

RANKL/OPG oranına göre yapılan değerlendirmelerde; hem Dp (p=0,00) hem de S-Dp (p=0,00) gruplarının kontrol ve S gruplarının her ikisine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu tespit edildi (p<0.05). Dp grubu kontrol (p=0,00), S (p=0,00), S-Mel (p=0,00), S-Dp-Mel (p=0,043) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek tespit edilirken, S-Dp (p=0,00) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük tespit edildi (p<0.05). S-Dp grubu diğer tüm gruplara (p=0,00) göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek tespit edildi (p<0.05). Dp (p=0,00), S-Dp (p=0,00) grupları S-Mel grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek

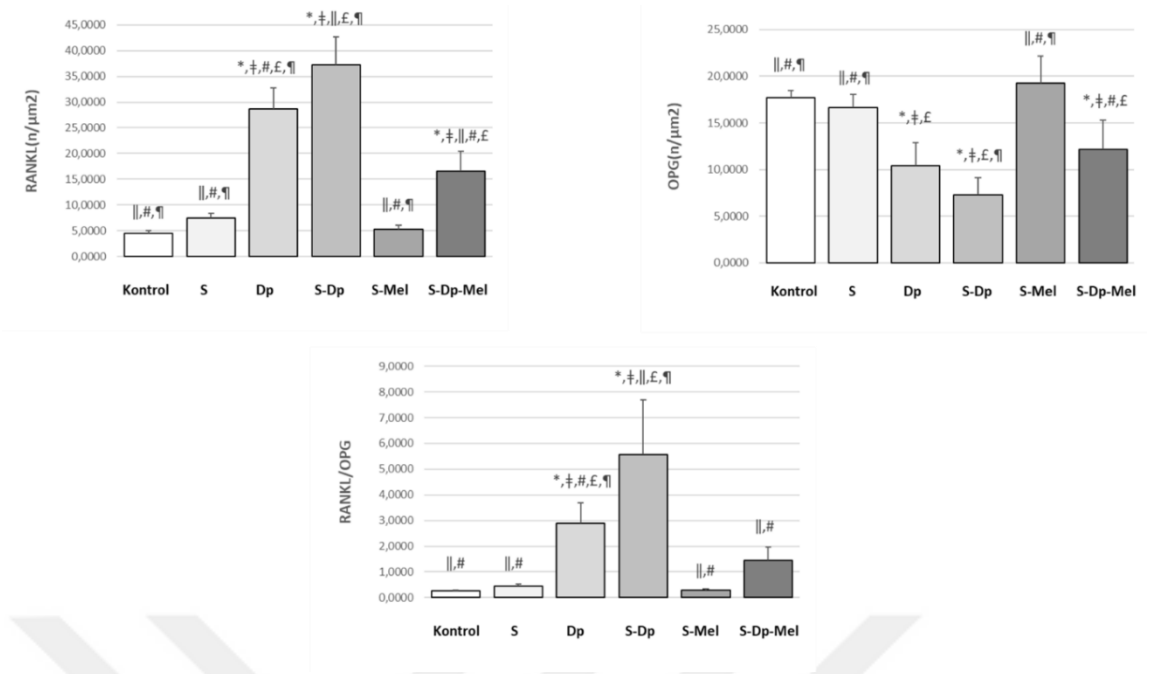
tespit edildi ($p<0.05$). Dp ($p=0,043$) ve S-Dp ($p=0,00$) grupları S-Dp-Mel grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek tespit edildi ($p<0.05$), (Şekil.4.4.).



Şekil.4.2. Histolojik kesitler üzerinde RANKL pozitif hücreler [Kesitler üzerinde immünohistokimyasal boyama ile RANKL pozitif hücrelerin belirlenmesi, A;kontrol, B;S, C;Dp, D;S-Dp, E;S-Mel, F;S-Dp-Mel gruplarını temsil etmektedir. **(**S;Restraint stres, Dp; Deneysel periodontitis, Mel; melatonin)]



Şekil.4.3. Histolojik kesitler üzerinde OPG pozitif hücreler [Kesitler üzerinde immünohistokimyasal boyama ile OPG pozitif hücrelerin belirlenmesi, A;kontrol, B;S, C;Dp, D;S-Dp, E;S-Mel, F;S-Dp-Mel gruplarını temsil etmektedir. **(**S;Restraint stres, Dp; Deneysel periodontitis, Mel; melatonin)]



Şekil.4.4. RANKL, OPG, RANKL/OPG seviyelerinin gruplar arasında karşılaştırılması, [**S**;Restraint stres, **Dp**; deneysel periodontitis, **Mel**; melatonin, Değerler ortalama ± SS olarak ifade edildi. *,ǂ,‖,#,£,¶sütunlar üzerindeki dipnot harfler gruplar arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları gösterir. Tek yönlü ANOVA ve Tukey testi yapıldı. ***** işareti p<0.05 kontrol , ǂ işareti p<0.05 S , ‖ işareti p<0.05 Dp , # işareti p<0.05 S-Dp , **£** işareti p<0.05 S-Mel , ¶ işareti p<0.05 S-Dp-Mel gruplarına göre anlamlı sonuçları temsil etmektedir.]

4.3. Biyokimyasal Bulgular

4.3.1. Doku Proinflamatuar ve Antiinflamatuar Sitokin ve Enzim Bulguları

4.3.1.1. Doku IL-lß, IL-10, IL-1ß / IL-10 Bulguları

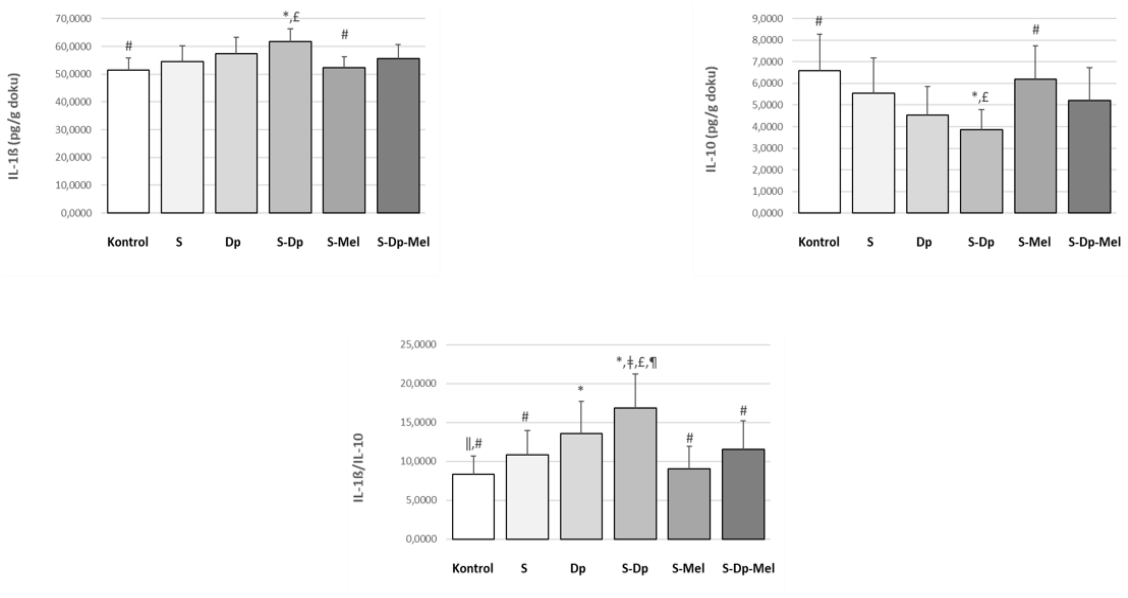
Dokularda incelenen IL-1ß seviyesi açısından S-Dp grubu hem kontrol (p=0,02) hem de S-Mel (p=0,007) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olacak düzeyde yüksek tespit edildi (p<0.05). S grubunda kontrol (p=0,806) ve S-Mel (p=0,951) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olmayacak düzeyde hafif bir yükseliş tespit edilirken, Dp (p=0,860), S-Dp (p=0,065), S-Dp-Mel (p=0,997) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olmayacak düzeyde hafif bir düşüş tespit edildi (p>0.05). Dp grubunda S-Dp (p=0,520) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayacak düzeyde hafif bir düşüş tespit edilse de kalan diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı olmayacak şekilde hafif bir yükseliş tespit edildi (p>0.05). S-Dp grubunda S (p=0,065),

Dp (p=0,520), S-Dp-Mel (p=0,178) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olmayacak düzeyde hafif bir yükseliş tespit edildi (p>0.05). S-Mel grubunda kontrol (p=0,999), grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayacak düzeyde hafif bir yükselme tespit edilse de S (p=0,951), Dp (p=0,352), S-Dp-Mel (p=0,761) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olmayacak düzeyde hafif bir düşüş tespit edildi (p>0.05). S-Dp-Mel grubunda kontrol (p=0,522) ve S-Mel (p=0,761) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olmayacak düzeyde hafif bir yükselme tespit edilse de kalan tüm gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı olmayacak şekilde hafif bir düşüş tespit edildi (p>0.05), (Şekil.4.5.).

Dokularda incelenen IL-10 seviyesi açısından hem kontrol (p=0,006) grubu hem de S-Mel (p=0,028) grubu S-Dp grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak düzeyde yüksek tespit edildi (p<0.05). Kontrol grubunda S (p=0,712), Dp (p=0,071), S-Mel (p=0,994), S-Dp-Me l(p=0,419) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olmayacak düzeyde hafif bir artış tespit edilirken, S-Dp grubunda S (p=0,2), Dp (p=0,936), S-Dp-Mel (p=0,433) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olmayacak düzeyde hafif bir düşüş tespit edildi (p>0.05). S grubunda kontrol (p=0,712), S-Mel (p=0,951) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olmayacak düzeyde hafif bir düşüş tespit edilirken, Dp (p=0,721), S-Dp (p=0,2), ve S-Dp-Mel (p=0,951) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olmayacak düzeyde hafif bir artış tespit edildi (p>0.05). Dp grubunda S-Dp (p=0,936) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayacak şekilde hafif bir artış tespit edilse de, kalan tüm gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı olmayacak düzeyde hafif bir düşüş tespit edildi (p>0.05). S-Mel grubunda kontrol (p=0,994) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayacak düzeyde hafif bir düşüş tespit edilse de S (p=0,951), Dp (p=0,224), S-Dp-Mel (p=0,759) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olmayacak düzeyde hafif bir artış tespit edildi (p>0.05). S-Dp-Mel grubunda kontrol (p=0,419), S

(p=0,997), S-Mel (p=0,759) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olmayacak düzeyde hafif bir düşüş tespit edilse de, Dp (p=0,934) ve S-Dp (p=0,433) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olmayacak düzeyde hafif bir artış tespit edildi (p>0.05), (Şekil.4.5.).

IL-1ß/IL-10 seviyesi Dp (p=0,049), S-Dp (p=0,00) gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak düzeyde yüksek tespit edildi (p<0.05). S-Dp (p=0,016) grubu S grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak düzeyde yüksek tespit edildi (p<0.05). Dp (p=0,049) grubu kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak düzeyde yüksek tespit edildi (p<0.05). S-Dp grubu kontrol (p=0,00), S (p=0,016), S-Mel (p=0,001), S-Dp-Mel (p=0,045) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olacak düzeyde yüksek tespit edildi (p<0.05). S-Dp (p=0,428) grubunda Dp grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayacak düzeyde hafif bir artış tespit edildi (p>0.05). S-Dp-Mel (p=0,718) grubunda S-Mel grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayacak düzeyde hafif bir artış tespit edildi (p>0.05), (Şekil.4.5.).



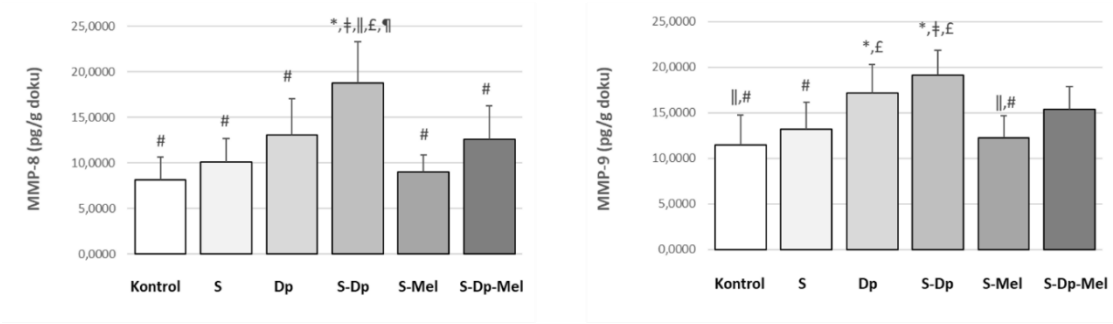
Şekil.4.5. IL-1ß, IL-10, IL-1ß/IL-10 seviyelerinin gruplar arasında karşılaştırılması **[S**;Restraint stres, **Dp**; deneysel periodontitis, **Mel**; melatonin, Değerler ortalama ± SS olarak ifade edildi. *,ǂ,‖,#,£,¶sütunlar üzerindeki dipnot harfler gruplar arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları gösterir. Tek yönlü ANOVA ve Tukey testi yapıldı. ***** işareti p<0.05 kontrol , ǂ işareti p<0.05 S , ‖ işareti p<0.05 Dp , # işareti p<0.05 S-Dp , **£** işareti p<0.05 S-Mel , ¶ işareti p<0.05 S-Dp-Mel gruplarına göre anlamlı sonuçları temsil etmektedir.]

4.3.1.2. Doku MMP-8, MMP-9 Bulguları

Dokuda incelenen MMP-8 seviyesi S-Dp grubunda kontrol (p=0,00), S (p=0,00), Dp (p=0,018), S-Mel (p=0,00), S-Dp-Mel (p=0,008) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olacak düzeyde yüksek tespit edildi (p<0.05). S grubunda kontrol (p=0,839), S-Mel (p=0,981) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olmayacak düzeyde hafif bir artış tespit edilirken , Dp (p=0,5), S-Dp-Mel (p=0,693) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olmayacak düzeyde hafif bir düşüş tespit edildi (p>0.05). Dp grubunda kontrol (p=0,054), S (p=0,5), S-Mel (p=0,16), S-Dp-Mel (p=1) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olmayacak düzeyde hafif bir artış tespit edildi (p>0.05). S-Mel grubunda kontrol (p=0,996) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayacak düzeyde hafif bir artış tespit edilirken, S (p=0,981), Dp (p=0,16), S-Dp-Mel (p=0,281) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olmayacak düzeyde hafif bir düşüş tespit edildi (p>0.05). Dp grubunda S-Dp-Mel (p=1) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayacak düzeyde

hafif bir artış tespit edilirken , S-Dp-Mel grubunda kontrol (p=0,108), S (p=0,693), S-Mel (p=0,281) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olmayacak düzeyde hafif bir artış tespit edildi (p>0.05), (Şekil.4.6.).

Dokuda incelenen MMP-9 seviyesi Dp (p=0,004), S-Dp (p=0,00) gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak düzeyde yüksek tespit edildi (p<0.05). S-Dp (p=0,002) grubu S grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak düzeyde yüksek tespit edildi (p<0.05). Dp grubu kontrol (p=0,004), S-Mel (p=0,015) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olacak düzeyde yüksek tespit edildi (p<0.05). S-Dp grubu kontrol (p=0,00) ,S (p=0,002) ,S-Mel (p=0,00) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olacak düzeyde yüksek tespit edildi (p<0.05). Dp (p=0,015), S-Dp (p=0,00) grupları S-Mel grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak düzeyde yüksek tespit edildi (p<0.05). S-Dp-Mel grubunda kontrol (p=0,088), S (p=0,644), S-Mel (p=0,243) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olmayacak düzeyde hafif bir artış tespit edilirken, Dp (p=0,824) ve S-Dp (p=0,12) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olmayacak şekilde hafif bir düşüş tespit edildi (p>0.05), (Şekil.4.6.).



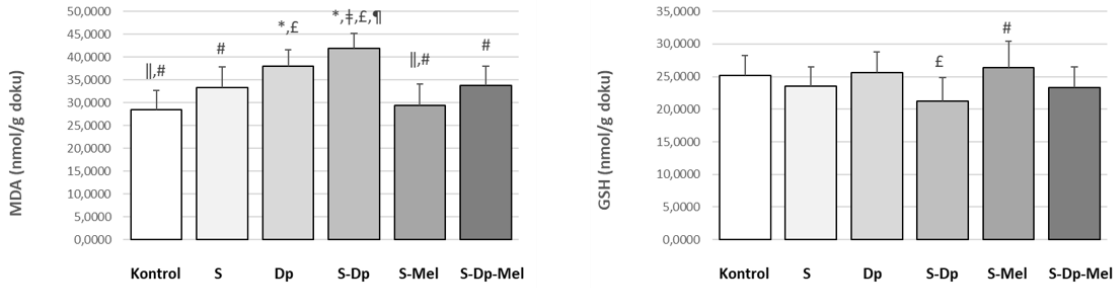
Şekil.4.6. MMP-8, MMP-9 seviyelerinin gruplar arasında karşılaştırılması **[S**;Restraint stres, **Dp**; deneysel periodontitis, **Mel**; melatonin, Değerler ortalama ± SS olarak ifade edildi. *,ǂ,‖,#,£,¶sütunlar üzerindeki dipnot harfler gruplar arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları gösterir. Tek yönlü ANOVA ve Tukey testi yapıldı. ***** işareti p<0.05 kontrol , ǂ işareti p<0.05 S , ‖ işareti p<0.05 Dp, # işareti p<0.05 S-Dp , **£** işareti p<0.05 S-Mel , ¶ işareti p<0.05 S-Dp-Mel gruplarına göre anlamlı sonuçları temsil etmektedir.]

4.3.2. Doku Oksidan - Antioksidan Parametrelerin Bulguları

4.3.2.1. Doku Malondialdehit ve Glutatyon Bulguları

Dokularda yapılan MDA tayini sonucuna göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulundu. Dp (p=0,01), S-Dp (p=0,00) grupları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek tespit edildi (p<0.05). S-Dp (p=0,02) grubu S grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek tespit edildi (p<0.05). Dp grubu kontrol (p=0,01) ve S-Mel (p=0,02) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek tespit edildi (p<0.05). S-Dp grubu kontrol (p=0,00), S (p=0,02), S-Mel (p=0,00), S-Dp-Mel (p=0,04) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek tespit edildi (p<0.05). Dp (p=0,02), S-Dp (p=0,00) grupları S-Mel göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek tespit edildi (p<0.05). S-Dp (p=0,04) grubu S-Dp-Mel grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek tespit edildi (p<0.05) ,(Şekil 4.7.).

Dokularda yapılan GSH tayini sonucuna göre S-Mel (p=0,041) grubu S-Dp grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak düzeyde yüksek tespit edildi (p<0.05). Kalan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar bulunmasa da S-Mel grubunda diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde hafif bir artış tespit edildi (p>0.05). Kontrol grubunda S (p=0,924), S-Dp (p=0,199), S-Dp-Mel (p=0,869) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde hafif bir artış tespit edilirken, Dp (p=1,00) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde hafif bir düşüş tespit edildi. (p>0.05). S-Dp-Mel grubu S-Dp (p=0,823) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde yüksek tespit edildi (p>0.05),(Şekil4.7.).



Şekil.4.7. MDA, GSH seviyelerinin gruplar arasında karşılaştırılması [**S**;Restraint stres, **Dp**; deneysel periodontitis, **Mel**; melatonin, Değerler ortalama ± SS olarak ifade edildi. *,ǂ,‖,#,£,¶sütunlar üzerindeki dipnot harfler gruplar arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları gösterir. Tek yönlü ANOVA ve Tukey testi yapıldı. ***** işareti p<0.05 kontrol , ǂ işareti p<0.05 S , ‖ işareti p<0.05 Dp , # işareti p<0.05 S-Dp , **£** işareti p<0.05 S-Mel , ¶ işareti p<0.05 S-Dp-Mel gruplarına göre anlamlı sonuçları temsil etmektedir.]

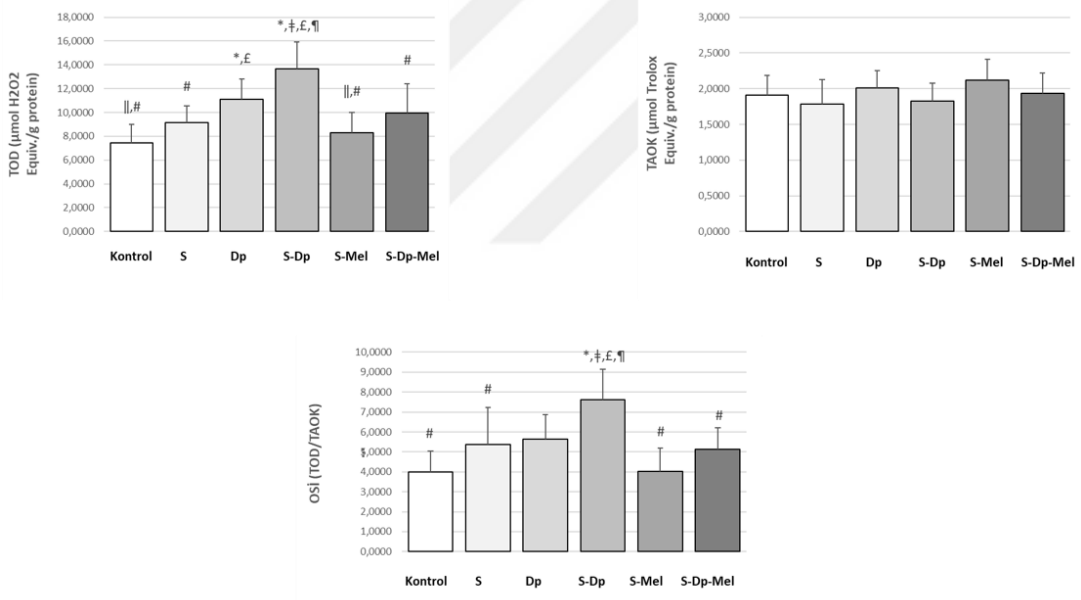
4.3.2.2. Doku TOD, TAOK ve OSİ Bulguları

Dokuda yapılan TOD değerlendirmesinde istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulundu. Dp (p=0,04), S-Dp (p=0,00) grupları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak düzeyde yüksek tespit edildi (p<0.05). S-Dp (p=0,00) grubu S grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak düzeyde yüksek tespit edildi (p<0.05). Dp grubu kontrol (p=0,04) ve S-Mel (p=0,045) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olacak düzeyde yüksek tespit edildi (p<0.05). S-Dp grubu kontrol (p=0,00), S (p=0,00), S-Mel (p=0,00), S-Dp-Mel (p=0,03) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olacak düzeyde yüksek tespit edildi (p<0.05). Dp (p=0,045) ve S-Dp (p=0,00) grupları S-Mel grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak düzeyde yüksek tespit edildi (p<0.05). S-Dp (p=0,03) grubu S-Dp-Mel grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak düzeyde yüksek tespit edildi (p<0.05), (Şekil.4.8.).

Dokuda yapılan TAOK değerlendirmesinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar bulunmasa da S-Mel grubunda diğer tüm gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde hafif bir yükselme tespit edildi (p>0.05). Tüm gruplara göre S grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde hafif bir düşüş tespit edildi (p>0.05). S-Mel (p=0,304) ve S-Dp-Mel (p=0,967) gruplarında ise S-Dp grubuna göre

istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde hafif bir yükselme tespit edildi (p>0.05), (Şekil.4.8.).

TOD ve TAOK değerlerinin oranlanması sonucu ortaya çıkan OSİ değeri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulundu. S-Dp grubu kontrol (p=0,00), S (p=0,022), S-Mel (p=0,00), S-Dp-Mel (p=0,008) gruplarına göre istatiksel olarak anlamlı olacak düzeyde yüksek tespit edildi (p<0.05). S-Dp-Mel grubunda kontrol (p=0,56) ve S-Mel (p=0,57) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde hafif bir yükseliş tespit edilirken S (p=0,99), Dp (p=0,97) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde hafif bir düşüş tespit edildi (p>0.05), (Şekil.4.8.).



Şekil.4.8. TOD, TAOK, OSİ seviyelerinin gruplar arasında karşılaştırılması. **[S**;Restraint stres, **Dp**; deneysel periodontitis, **Mel**; melatonin, Değerler ortalama ± SS olarak ifade edildi. *,ǂ,‖,#,£,¶sütunlar üzerindeki dipnot harfler gruplar arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları gösterir. Tek yönlü ANOVA ve Tukey testi yapıldı. ***** işareti p<0.05 kontrol , ǂ işareti p<0.05 S , ‖ işareti p<0.05 Dp , # işareti p<0.05 S-Dp , **£** işareti p<0.05 S-Mel , ¶ işareti p<0.05 S-Dp-Mel gruplarına göre anlamlı sonuçları temsil etmektedir.]

4.3.3. Serum Kortikosteron Bulguları

Serumda incelenen kortikosteron seviyesi S (p=0,00) ve S-Dp (p=0,00) grupları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak düzeyde yüksek tespit edildi (p<0.05). S grubu kontrol (p=0,00), Dp (p=0,00), S-Mel (p=0,00), S-Dp-Mel (p=0,00) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olacak düzeyde yüksek tespit edildi (p<0.05). S (p=0,00) ve S-Dp (p=0,00)grupları Dp grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak düzeyde yüksek tespit edildi (p<0.05). S-Dp grubu kontrol (p=0,00), Dp (p=0,00), S-Mel (p=0,01), S-Dp-Mel (p=0,00) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olacak düzeyde yüksek tespit edildi (p<0.05). S grubu S-Mel (p=0,00) ,S-Dp-Mel (p=0,00) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olacak düzeyde yüksek tespit edildi (p<0.05). S-Dp grubu S-Mel (p=0,01) ,S-Dp-Mel (p=0,00) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olacak düzeyde yüksek tespit edildi (p<0.05), (Tablo.4.2.).

Tablo.4.2. Kortikosteron seviyelerinin gruplar arasında karşılaştırılması

Parametre	Kontrol	Stres	Dp	S-Dp	S-Mel	S-DP-Mel
Kortikosteron (ng/ml serum)	0,5613 ± 0,16856$^{ǂ,\#}$	1,4338 ± 0,28405$^{*,‖,£,¶}$	0,6600 ± 0,22071$^{ǂ,\#}$	1,3713 ± 0,27859$^{*,‖,£,¶}$	0,8525 ± 0,21191$^{ǂ,\#}$	0,7938 ± 0,18554$^{ǂ,\#}$

[S;Restraint stres, **Dp**; deneysel periodontitis, **Mel**; melatonin, Değerler ortalama ± SS olarak ifade edildi$^{*,ǂ,‖,\#,£,¶}$ aynı satırdaki dipnot harfler gruplar arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları gösterir. Tek yönlü ANOVA ve Tukey testi yapıldı. ***** işareti p<0.05 kontrol, ǂ işareti p<0.05 S, ‖ işareti p<0.05 Dp , # işareti p<0.05 S-Dp **,£** işareti p<0.05 S-Mel **,** ¶ işareti p<0.05 S-Dp-Mel gruplarına göre anlamlı sonuçları temsil etmektedir.]

4.4. Fizyolojik Bulgular

4.4.1. Açık Alan Testi bulguları

Açık alan testi sonucunda elde edilen parametreler katedilen toplam mesafe miktarı bakımından incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılıklar tespit edilememiştir. Buna rağmen S grubunda kontrol (p=0,598) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayacak düzeyde hafif bir düşüş tespit edilirken, S-Mel

(p=0,299) ve S-Dp-Mel (p=0,238) gruplarının da S grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayacak düzeyde hafif bir düşüş gösterdiği tespit edilmiştir (p>0.05), (Tablo.4.3.).

Açık alan testi sonucunda elde edilen parametreler ortalama hız miktarı bakımından incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edilememiştir. Buna rağmen S grubunda control (p=0,568) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayacak düzeyde hafif bir düşüş tespit edilmiştir (p>0.05), (Tablo.4.3.).

Açık alan testi sonucunda elde edilen parametreler toplam immobilite zamanı bakımından incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edilememiştir. Buna rağmen S (p=0,061) ve S-Dp (p=0,684) gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayacak düzeyde hafif bir yükseliş gösterdiği tespit edilmiştir (p>0.05). S-Mel (p=0,503) ve S-Dp-Mel (p=0,499) gruplarında S grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayacak düzeyde hafif bir düşüş tespit edilmiştir (p>0.05), (Tablo.4.3.).

Açık alan testi sonucunda elde edilen parametreler merkezde harcanan süre bakımından incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir. kontrol grubunun S (p=0,009), S-Dp (p=0,008), S-Dp-Mel (p=0,016) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olacak düzeyde yüksek olduğu tespit edilmiştir (p<0.05), (Tablo.4.3.).

Açık alan testi sonucunda elde edilen parametreler kenarlarda geçirilen zaman bakımından incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edilememiştir. Kontrol grubunda S (p=0,928), S-Dp (p=0,999), S-Mel (p=0,185), S-Dp-Mel (p=0,829) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olmayacak şekilde hafif bir düşüş tespit edilmiştir (p>0.05), (Tablo.4.3.).

Açık alan testi sonucunda elde edilen parametreler merkeze giriş sayısı bakımından incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir. Kontrol grubunun S (p=0,03), S-Dp (p=0,032), S-Dp-Mel (p=0,022) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olacak düzeyde yüksek olduğu tespit edilmiştir (p<0.05). S grubunda S-Mel (p=0,176), S-Dp-Mel (p=0,382) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olmayacak düzeyde hafif bir düşüş tespit edildi (p>0.05). S-Dp grubunda S-Mel (p=0,99), S-Dp-Mel (p=1) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olmayacak düzeyde hafif bir düşüş tespit edildi (p>0.05), (Tablo.4.3.).

Açık alan testi sonucunda elde edilen parametreler çizgi geçme sayısı bakımından incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edilememiştir. Kontrol grubunun kalan tüm gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı olmayacak düzeyde hafif bir düşüş gösterdiği tespit edilmiştir (p>0.05). S-Mel (p=1) ve S-Dp-Mel (p=1) gruplarında S grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayacak düzeyde hafif bir düşüş tespit edilmiştir (p>0.05). S-Dp grubu diğer tüm gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde hafif bir artış gösterdi (p>0.05). S-Dp (p=0,996) , S-Mel (p=1) ve S-Dp-Mel (p=0,998) gruplarında Dp grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayacak düzeyde hafif bir artış gösterdiği tespit edilmiştir (p>0.05), (Tablo.4.3.).

Açık alan testi sonucunda elde edilen parametreler tımarlanma bakımından incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edilememiştir (Tablo.4.3.).

Açık alan testi sonucunda elde edilen parametreler şaha kalkma bakımından incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edilememiştir (Tablo.4.3.).

Açık alan testi sonucunda elde edilen parametreler bolus bakımından incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir. S grubunun S-Dp-Mel (p=0,021) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak düzeyde yüksek olduğu tespit edilmiştir (p<0.05). S-Dp grubunun S-Dp-Mel (p=0,014) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde yüksek olduğu tespit edilmiştir (p<0.05). S grubunda S-Mel (p=0,997) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayacak düzeyde hafif bir artış tespit edilmiştir (p>0.05), (Tablo.4.3.).

Tablo.4.3. Açık Alan testi parametrelerinin gruplar arasında karşılaştırılması

Parametre	Kontrol	S	DP	S-DP	S-Mel	S-DP-Mel
Total distance (m)- (Toplam mesafe)	15,20 ± 1,51	11,95 ± 0,68	15,70 ± 1.3	15,62 ± 1,26	16,23 ± 1,25	16,49 ± 2,14
Average speed (m/s) - Ortalama hız	0,05 ± 0,005	0,04 ± 0.002	0,05 ± 0.004	0,05 ± 0.004	0,05 ± 0.004	0,05 ± 0.007
Total immobility time (s)- Toplam immobilite süresi	156,31 ± 15,90	206,22 ± 8,90	157,4 ± 15,16	181,62 ± 7,49	175,97 ± 7,01	175,85 ± 14.87
Time spent in the central area (s)- merkezde harcanan zaman	27,88 ± 8,12‡,#,¶	10,15 ± 3,73*	16,85 ± 5.06	9,39 ± 1,48*	16,26 ± 1.08	11,15 ± 1.39*
Time spent in the margin (s)- kenarlarda harcanan zaman	274,18 ± 7,99	295,32 ± 4, 52	276,23 ± 7,.293	294.42 ± 8,60	279,43 ± 1,16	292,58 ± 1.53
Number of entries to the central area- merkeze giriş sayısı	4,75 ± 1.03‡,#,¶	2,62 ± 0.53*	3,75 ± 0.59	2.12 ± 0.44*	3.62 ± 0.37	3,10 ± 0.18*
Number of line crossing-Çizgi geçme sayısı	184,31 ± 18.51	222,62 ± 7,66	185,62 ± 19.46	224,75 ± 17,95	189,75 ± 13,13	192,5 ± 24,42
Grooming sayısı- tımarlanma	5,5 ± 0.86	4, 62 ± 0.86	5,25 ± 0,49	5,87 ± 0,44	5 ± 0.42	5,5 ± 1,05
Rearing sayısı- şahlanma davranışı	1,13 ± 0.22	2,75 ± 0,41	2,26 ± 0,92	1,84 ± 0,37	2,03 ± 0,46	2,12 ± 0,54
Defekasyon Bolus sayısı	5 ± 0,53	7 ± 0,68¶	5,5 ± 0,42	7,12 ± 0,58¶	6,62 ± 0,49	4,5 ± 0,72‡,#

[S;Restraint stres, **Dp**; deneysel periodontitis, **Mel**; melatonin, Değerler ortalama ± SS olarak ifade edildi*,‡,‖,#,£,¶ aynı satırdaki dipnot harfler gruplar arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları gösterir. Tek yönlü ANOVA ve Tukey testi yapıldı. * işareti p<0.05 kontrol, ǂ işareti p<0.05 S, ‖ işareti p<0.05 Dp , # işareti p<0.05 S-Dp ,£ işareti p<0.05 S-Mel , ¶ işareti p<0.05 S-Dp-Mel gruplarına göre anlamlı sonuçları temsil etmektedir]

5.TARTIŞMA

Stres, yeni durumlarla karşılaşıldığında kişinin bedensel ve ruhsal sınırlarının zorlanması sonucu vücutta ortaya çıkan bazı mekanizmalarla kendini gösteren bir uyum sağlama reaksiyonudur. Bu varoluşsal savunma yanıtında mücadele etme (savaş) veya kaçma tepkisi söz konusudur.[6] Psikolojik stresin kardiyovasküler, metabolik, romatolojik hastalıkların yanı sıra otoimmün veya neoplastik etiyolojiye sahip kronik hastalıklarda da inflamatuar cevabı şiddetlendirdiği bilinmektedir .[7, 8]

Psikolojik stres periodontal hastalıklar için kesin olarak bir risk faktörü değil ise de risk indikatörü olarak tanımlanmıştır.[9] Stres, periodontitis ve diğer enflamatuar periodontal hastalıkların şiddetlenmesiyle nedensel olarak ilişkili, değiştirilebilir potansiyel bir risk faktörüdür.[10] Güncel literatürde periodontitis ve psikolojik stres arasındaki ilişkiyi gösteren birçok epidemiyolojik[9, 11-13] ve hayvan çalışmaları [14-16] bulunmaktadır. Dahası, psikolojik stres altındaki bireylerde cerrahisiz periodontal tedavi başarısı, stressiz bireylere kıyasla düşük bulunmuştur.[17, 18] Klinik gözlemler ve epidemiyolojik çalışmalar göstermiştir ki; psikolojik faktörler periodontitis gelişmesine olan yatkınlığı arttırabilir.

Stresin inflamatuar hastalıklar üzerindeki etkisinin daha çok nöroendokrin sistem salgılarının nötrofil, lenfosit ve makrofaj fonksiyonlarını modüle etmesi yoluyla gerçekleştiği düşünülmektedir[19, 20] Yapılan çalışmalarda depresyon ve stres etkenlerine mağruz kalmanın immün sistemi olumsuz etkileyerek periodontal sağlığın bozulmasına yol açtığı gösterilmiştir.[197, 198] Psikolojik stresin, hücresel immün yanıtı 3 mekanizma ile baskıladığı bilinmektedir.[199, 200] İlk mekanizmada stres kaynaklı oluşan yanıt, HPA aksını başlatır , bu aksın aktivasyonu hipofiz bezinden kortikotropin serbestleştirici hormon salınımını ve böbreküstü bezinin korteksinden glukokortikoid hormon salınımını teşvik eder. Suprarenal bölgeden salgılanan glukokortikoid salınımını arttırdığı

kortizolün etkisiyle proenflamatuvar sitokinlerin (interlökinler ,prostoglandinler ,tumor nekroz faktör) üretimini azaltır ve immünsüpresif bir etki oluşturur.[201, 202] Oluşan stresin kronikleşmeye başlamasıyla yüksek düzeyde salınan kortizol, akut stres durumdaki immünsüpresif fonksiyonunun aksine reseptörlerde oluşan rezistans sebebiyle immün yanıtı regüle edemez ve proinflamatuar sitokinlerin aşırı salınımı ile karakterize yıkıcı konak yanıtını şiddetlenir.[7, 21] İkinci mekanizmada ise maruz kalınan stresörler sempatik sinir sistemini stimüle eder, adrenal medulladan adrenalin ve nöradrenalin salınımını arttırır. Böylece hem kan akış hızında hem de vücut savunmasında görev alan, dolaşımda bulunan immün savunma hücrelerinde azalma meydana gelir. Bunun sonucunda immünosüpresif bir etki oluşur. Bu etki dolaylı olarak periodontal doku yıkımına katkıda bulunur.[201, 202] Son mekanizmada ise stres, duyusal sinir liflerinden nöropeptid salımını tetikler. Nöropeptidlerin varlığı sitokin salınımını uyarır ve damar geçirgenliğini arttırır. Nöropeptid kaynaklı enflamasyon dokularda yıkıma sebep olur.[203] Bu bağlamda,stresin immün sistem üzerine olan çok yönlü olumsuz etkilerinin, kronik enflamatuvar bir hastalık olan periodontitisin patogenezinede rol oynayabileceği düşünülebilir.

Çalışmamızın 2 temel amacı psikolojik stresin periodontal doku yıkımı üzerine etkileri ve sistemik melatonin uygulamasının önleyici etkinliğini araştırmaktı. Bu amaçla ratların alt birinci azı dişleri etrafına ligatür bağlanıp, 35 gün yerinde kalması sağlanarak periodontitis ilişkili inflamatuar doku cevabı ve kemik yıkımı indüklendi. Psikolojik stres oluşturmak amacıyla ligatürlemenin yapıldığı günden başlayarak 35 gün boyunca restraint stres uygulandı. Ratlara melatonin uygulaması ise ligatür uygulamasını takip eden 22. gün başlatılarak erken dönemde doku yıkımı üzerindeki önleyici etkileri araştırıldı. Bilgilerimize göre çalışmamız psikolojik stres ilişkili periodontitis kaynaklı doku yıkımı üzerine melatoninin önleyici etkinliğini biyokimyasal, histopatolojik ve

immünohistokimyasal olarak kapsamlı bir şekilde inceleyen ilk çalışma olma özelliğindedir.

Deneysel hayvan çalışmaları; bilginin elde edilmesini takiben klinik yararlılığının sağlanması, neden-sonuç ilişkilerinin belirlenmesi ve verilerin daha etkili analiz edilebilmesi için büyük bir öneme sahiptir.[279] Herhangi bir tedavi yaklaşımının insanlara uygulanmadan önce hastalığa etkisinin bağımsız ve tarafsız bir şekilde değerlendirilmesi ve güvenilirliğinin test edilmesi bakımından hayvan çalışmaları önemli bir fayda sağlar.[280] Fare veya rat gibi kemirgen modellerinden, inflamasyon sırasında sert ve yumuşak doku arasındaki etkileşimler hakkında önemli veriler elde edilebilmektedir. Bunun yanısıra, sistemik inflamasyonun potansiyel mekanizmaları ve bunun periodontal iyileşme süreci üzerindeki etkisi *in vivo* olarak incelenebilmektedir.[280]

Periodontoloji alanında yararlanılan birçok farklı hayvan modeli bulunsa da[281] ratlar, periodontal hastalıkların patogenezi için en sık çalışılan deney hayvanlarıdır ve deneysel çalışmalarda insanda bulunan molar diş bölgelerinin periodontal yapılarına benzerlik göstermeleri, maliyetlerinin yüksek olmaması, yaşam şartlarının kolayca sağlanabilmesi ve çokça üretilebilmeleri nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Deneysel periodontal hastalığın klinik ve histopatolojik bulguları yönüyle insanlara oldukça benzer özellikler gösterdiği rapor edilmiştir. Wistar Albino ve Spraque-Dawley ratları en sık kullanılan türler olarak literatürdeki yerini almıştır.[282, 283]

Deneysel periodontal hastalık oluşumu için ratların periodontal dokularında inflamasyonun indüklenmesi 2 farklı yaygın kullanılan yöntemle gerçekleşir. İlk yöntem periodontal hastalık oluşturulmak istenen bölgeye bakteriler ve/veya bakteriyel virülans faktörlerinin (örneğin; LPS) enjekte edilmesi sonucu akut bir periodontal patolojinin meydana gelmesidir. Bu yöntemin avantajı hastalığın gelişiminin hızlı bir şekilde sağlanmasıdır. Ancak bu yöntem bakteriyel endotoksinlere karşı verilen akut inflamatuar

yanıt ve periodontal hastalığın bakteriler tarafından oluşturulmaması sebebiyle dezavantajlara sahiptir.[279]

İkinci yöntem ise periodontal hastalığı indüklemek için ratların azı dişleri etrafına ligatür uygulanması yoluyla plak retansiyon alanlarının, dolayısıyla mikroorganizma kolonizasyonunun arttırılmasıdır. Bu yöntem dentogingival bölgede mekanik travmaya ve dental plağa karşı gelişen konak yanıtının yoğun olmasına ve doku bütünlüğünün bozulmasına imkan verir. Bu yöntem önceki çalışmalarda kullanılmış başarılı bir yöntemdir.[267, 284] Çalışmamızda sprague dawley cinsi ratların molar dişlerinin etrafına 3.0 ipek ligatür bağlayarak periodontitis indüklendi.

Deney hayvanlarında stres oluşturmak için birçok farklı yöntem kullanılabilmektedir. İmmobilizasyon stresi ,restraint(kısıtlama) stresi, ayak elektrik şoku, sosyal izolasyon stresi deneysel stres modellerinin en yaygın olarak kullanılanlarıdır.[285] Psikolojik stresörler, sosyal düzen çatışmalarını, kaynaklar için rekabeti, anksiyete ve korkuyla beraber hareket kısıtlanmasını ve hareketsizliği içerebilir.[286] Hayvan stres modelleri birçok nedenden dolayı değerlidir. İnsana nazaran metabolik, anatomik ve hücresel farklılıkları olmasına rağmen hayvan stres modelleri biyo-psiko-sosyal organizmaların stres mekanizmalarının anlaşılmasında en iyi yaklaşımı sunar.[287] Hayvan deneyleri stres koşulları literatürde halen tartışılıyor olsada, stres indüksiyonu için en sık kullanılan deneysel hazırlık ratın hareketlerinin kısıtlandığı restraint stres ve ratın hareketsizleştirildiği immobilizasyon stres protokolüdür.[288]

Restraint (kısıtlama) stresi büyük ölçüde basit ve ağrısız olduğu ve kalıcı bir güçsüzlük oluşturmadığı için tercih edilir. Restraint (kısıtlama) stresi fiziksel olarak bir hareket kısıtlama ile psikiyatrik stres için model oluşturur.[269, 289, 290] Bu tekniğin avantajı maliyetinin uygun olması ve kısıtlama sona erdikten sonra hayvanın bedensel olarak zarar görme olasılığının çok düşük olmasıdır. Restraint stres, stresin uzun süreli etkilerini

anlayabilmek için uygun bir yöntemdir.[291] Restraint stres ACTH(adrenokortikotropik hormon), kortikosteron , HPA yanıtının desentizasyonunu, sitokin ekspresyonu düzey değişikliklerini etkin bir biçimde incelemeye olanak verir.[292] Kısıtlama ile ilişkili meydana gelen psikolojik ve fizyolojik değişiklikler ağrı mekanizmalarının herhangi bir eş zamanlı aktivasyonundan veya geri dönüşümü olmayan rahatsızlıktan ziyade, hareketsiz kalmanın sıkıntılı ve caydırıcı doğasından kaynaklanmaktadır.[293]

Restraint stresin uygulanma şekli ve süresi (sa/gün) açısından literatürde bir konsensüs yoktur. Deneysel periodontitis modeli ile kombine restraint stres çalışmalarında da çok çeşitli uygulama şekilleri görülmektedir: Takada ve Ark.[15]; 12sa/gün olmak üzere 10 gün boyunca, Nakajima ve Ark[16]. tarafından 12sa/gün olmak üzere 22 gün boyunca, Peruzzo ve Ark.[14] tarafından 12sa/gün olmak üzere 30 gün boyunca, Foureaux ve Ark.[294] tarafından uygulanan immobilizasyon stresi 2,5sa/gün olmak üzere 30 gün boyunca , Segundo ve Ark.[295] tarafından 12sa/gün olmak üzere 30 gün boyunca, Takeda ve Ark.[296] tarafından 12sa/gün olmak üzere 30 gün boyunca, Benatti ve Ark.[297] tarafından 2sa/gün olmak üzere 40 gün boyunca, Rettori ve Ark.[298] tarafından 2sa/gün olmak üzere 7 gün boyunca, Gasperic ve ark.[299] tarafından 12sa/gün olmak üzere 28 gün boyunca uygulandı. Bu çalışmada ise Peruzzo ve ark.[14] kısmen benzer şekilde 12sa/gün olmak üzere 35 günlük restraint stres protokolü tercih edildi. Ratlar gece hayvanları oldukları için stres protokolü 20:00 ile 08:00 saatleri arasında sınırlandırılmıştır.[16] Restraint stres uygulama süresi içerisinde hem deneysel periodontitis hem de melatonin uygulama sürecini barındırdığından ve uygulanan stres karakterinin akut değil kronik karakterde olması istenildiğinden [269] 35 gün boyunca uygulanmıştır.

Preklinik deneysel stres çalışmalarında deney hayvanlarının stres durumlarının değerlendirilmesinde açık alan testi (open field test), delikli tahta testi (hole board test), sosyal etkileşim testi (social interaction test) gibi davranışsal testlerin yanında plazma

kortikosteron seviyesi, ACTH hormon seviyesi gibi biyokimyasal parametreler ve besin alımı , vücut ağırlığı gibi fizyolojik parametreler kullanılmaktadır.[269]

Açık alan testi ratların kaçışının önlendiği, yeni bir açık alana yerleştirildiklerindeki anksiyete (kaygı) benzeri davranışsal tepkilerini ölçmek için tasarlanmış bir davranış testidir. Bu testte ratların lokomotor aktiviteleri dikkate alınır. Kemirgenler genellikle kapalı alanlarda vakit geçirmeyi tercih ederler ve bu nedenle açık alanın çevresini merkeze kıyasla keşfetmek için daha fazla zaman harcarlar. [274] Açık alan testinde anksiyete düzeyinin belirlenmesi ile ilgili çok sayıda farklı davranış (iki ayağı üzerine kalkma, kaşınma, gezinme vb.) ve parametre bulunmaktadır. Bu davranış biçimlerinden biri olan iki ayağı üzerine ya da şaha kalkma olarak adlandırılan davranış, ratın çevreye olan merak duygusunun anksiyete duygusuna baskın gelmesiyle ortaya çıkar. Rat bu davranışı kenar desteği alarak ya da almayarak sergileyebilir.[276] Açık alan testi sırasında meydana gelen kaşınma hareketi ise stereotipik aktivite (kendine özgü tekrarlayan davranışlar) ile ilgilidir. Artmış stereotipik aktivite anksiyete hakkında bilgi verebilir ancak doğrudan anksiyeti değerlendirmek için kullanılmaz.[277] Alıştığı koşulların aksine bir ortama yerleştirilen rat anksiyete artışı ile birlikte daha az hareket eder ve defekasyon bolus davranışlarında artış meydana gelir.[275, 278] Bu çalışmada stres durumunun değerlendirilmesi için plazma kortikosteron seviyeleri ve açık alan testi parametreleri kullanılmıştır. Stres durumunun belirlenmesinde parametre olarak hem adrenokortikal fonksiyon hem de davranışta meydana gelen anomalileri kullanmak, kullanılan diğer yöntemlere göre daha güvenilir bulunmuştur.[300]

Çalışmamızda elde ettiğimiz kortikostreon parametresiyle ilgili bulgular; restraint stresin S ve S-DP gruplarında diğer tüm gruplara göre anlamlı düzeyde bir artış meydana getirdiğini göstermektedir ($p<0.05$), bununla birlikte melatonin, S-Mel ve S-DP-Mel gruplarında S ve S-DP gruplarına göre kortikosteron seviyelerinde anlamlı düzeyde bir

düşüş meydana getirmiştir ($p<0.05$). Dp grubu ise kontrol grubuna kıyasla hafifçe yüksek tespit edildi. ($p>0.05$). Buna rağmen ilginç bir şekilde S grubunda , S-DP grubuna göre anlamlı olmayan düzeyde hafif bir artış meydana gelmiştir ($p>0.05$). Çalışmamızda restraint stres düzeyinin değerlendirildiği parametreleri genel olarak stres gruplarında arttığı melatonin uygulamasının ise çeşitli düzeylerde azalma sağladığı tespit edilmiştir. Bulgularımızı destekler şekilde Takada ve Ark.[15] periodontitisli ratlarda kan glukozu, ACTH konsantrasyonu ve adrenalin seviyesi ölçümlerinde; restraint stres uygulanan gruplarda, uygulanmayan gruplara göre anlamlı düzeyde artış meydana geldiğini raporlamışlardır. Nakajima ve Ark[16] ise serum kortikosteron ve kortizol seviyelerinin ölçümlerinde; restraint stres uygulanan gruplarda kontrol ve deneysel periodontitis gruplarına göre anlamlı düzeyde artış meydana geldiğini bildirmişlerdir. Peruzzo ve Ark.[14] serum kortikosteron, adrenalin ve nöradrenalin seviyelerinin ölçümlerinde; periodontitisli ratlara restraint stres uygulanan grupta, kontrol ve deneysel periodontitis gruplarına göre anlamlı düzeyde artış meydana geldiğini göstermişlerdir. Bir diğer çalışmada ise Foureaux ve ark.[294] serum kortikosteron, kan glukozu ve C-peptid (insülin üretimi için referans) seviyelerinin ölçümlerinde restraint stres uygulanan gruplarda uygulanmayan gruplara göre anlamlı düzeyde artış meydana geldiğini, probiyotik ve deneysel periodontitis birlikte uygulamasının ise stresin biyokimyasal belirteçleri açısından anlamlı bir fark oluşturmadığını raporlamışlardır. Takeda ve Ark.[296] serum kortikosteron ve kortizol seviyelerinin ölçümlerinde; yalnızca restraint stres uygulanan grupta, kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artış meydana geldiğini bildirmişlerdir. Juzentaihoto kullanılan restraint stres grubunda, restraint stres grubuna göre stres belirteçleri belirgin şekilde düşüş göstermesine rağmen kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artış gösterdiği raporlanmıştır. Rettori ve Ark.[298] serum kortikosteron seviyelerinin ölçümlerinde; restraint stres, deneysel periodontitis, restraint stres-deneysel

periodontitis gruplarının kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek bulunduğunu bildirmişlerdir.

Sunulan bulgular, literatürdeki çalışmalarla uyumlu olup , kortikosteron seviyesi S ve S-Dp gruplarında Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak düzeyde yüksek tespit edildi ($p<0.05$). S-Mel ve S-Dp-Mel gruplarında kontrol grubuna göre meydana gelen istatistiksel olarak anlamlı olmayan hafif artış, stresin ratlar üzerinde oluşturduğu etkinin melatonin tarafından kısıtlanmasının sonucu olarak meydana geldiği düşünülmektedir ($p>0.05$).

Psikolojik stres varlığında kortikosteron seviyelerinde meydana gelen artış, HPA aksının uyarılması sonucu hipofiz bezinden kortikotropin serbestleştirici hormon salınımını ve böbreküstü bezinin korteksinden glukokortikoid hormon salınımının arttırılması sonucu meydana gelir.[201, 202] Melatonin, HPA aksının aktivasyonunu inhibe ederek, glukokortikoid hormonunun salınımını, dolayısıyla kortizol oluşumunu baskılayabilir.[256-259]

Çalışmamızda, merkezde harcanan süre ve merkeze giriş sayıları S grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde bir düşüş gösterirken ($p<0.05$), S-Mel grubu, S grubuna göre anlamlı olmayan düzeyde hafif bir artış göstermiştir ($p>0.05$). Dp grubu merkezde harcanan süre ve merkeze giriş sayısı bakımından kontrol grubuna göre anlamlı olmayan düzeyde hafif bir düşüş ($p>0.05$) sağlasada, S-DP grubu kontrol grubuna göre anlamlı olacak düzeyde düşüş meydana getirmiştir ($p<0.05$). S-Dp-Mel grubu, S-Dp grubuna göre merkezde harcanan süre bakımından anlamlı olmayan düzeyde hafif bir artış meydana getirirken ($p<0.05$), kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artış sağlamıştır ($p<0.05$). Defekasyon seviyeleri, S-Dp-Mel grubunda S ve S-Dp gruplarına göre anlamlı düzeyde azalmıştır ($p<0.05$). Restraint stres uygulanan bütün gruplarda, uygulanmayan

gruplara göre defekasyon seviyesi açısından anlamlı bir fark ortaya çıkmamıştır. Toplam mesafe, ortalama hız, toplam immobilite, kenarlarda geçirilen zaman, çizgi geçme sayısı, tımarlanma ve şahlanma davranışları açısından gruplar arasında anlamlı farklar bulunamamıştır. Davranış testlerinin sonuçları değerlendirilirken elde edilen bulgularda stres uyaranlarına verilen yanıtın denekler arasında önemli bireysel farklılıklar gösterebileceği bilgisi dikkate alınmalıdır. Sunulan bulgularda restraint stres düzeyinin değerlendirildiği parametrelerin genel olarak stres gruplarında arttığı, melatoninin uygulamasının ise çeşitli düzeylerde azalma sağladığı tespit edilmiştir. Bulgularımızı destekler şekilde Rettori ve ark.[298] geçilen çizgi sayısı seviyesinin restraint stres grubunda ,deneysel periodontitis grubunda ve deneysel periodontitis-restraint stres grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olduğunu bildirmiştir. Birmann ve ark.[301] restraint stres uygulanan gruplarda kontrol gruplarına göre geçilen çizgi sayısı, şahlanma seviyeleri açısından anlamlı bir fark olmadığını, merkeze giriş sayısı ve merkezde harcanan süre seviyelerinin restraint stres uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşük olduğunu, tımarlanma seviyelerinin ise restraint stres uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artış gösterdiğini bildirmiştir. D'amico ve ark.[302] restraint stres uygulanan grupta kontrol grubuna göre çizgi geçme sayısı ve merkezde harcanan süre seviyelerinin anlamlı düzeyde düştüğünü raporlamışlardır. Lieben ve ark.[278] stres uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre defekasyon sayılarında anlamlı düzeyde artış meydana geldiği göstermiştir.

Sunulan bulgular, literatürdeki çalışmalarla uyumlu olup, merkezde geçirilen süre ve merkeze giriş sayıları seviyesi S, S-Dp ve S-DP-Mel gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak düzeyde düşük tespit edildi ($p<0.05$). S-Mel grubunda kontrol grubuna göre meydana gelen istatistiksel olarak anlamlı olmayan hafif artış ($p>0.05$) ve S-Dp-Mel grubunda S-Dp grubuna göre meydana gelen istatistiksel olarak

anlamlı olmayan hafif artış ($p>0.05$), stresin ratlar üzerinde oluşturduğu etkinin melatonin tarafından kısıtlanması sonucu meydana geldiği düşünülmektedir. Defekasyon seviyelerinde S-Dp-Mel grubunda S ve S-Dp gruplarına göre meydana gelen anlamlı düzeyde azalma ($p<0.05$) merkeze giriş ve merkezde harcanan süre parametrelerine uyumlu olup stresin ratlar üzerinde oluşturduğu etkinin melatonin tarafından kısıtlandığını göstermektedir.

Stres ve uyku bozuklukları birbiriyle çift taraflı nedensellik ilişkisi bulunduran ve HPA aksını ortak olarak uyaran iki durumdur.[10] Kronik stresin uykunun Rem fazında geçirilen zamanı kısıtladığı[303, 304], Rem fazındaki değişikliklerin ise depresyon benzeri kognitif davranışsal farklılıklarla ilişkili olduğu bilinmektedir.[305] Uyku bozuklukları ayrıca vücutta üretilen endojen melatoninin miktarını azaltmaktadır.[260] Ratlara sistemik olarak uygulanan eksojen melatoninin HPA aksının direk inhibisyonuna[256-259] ek olarak restraint stresin ratlar üzerinde sebep olduğu muhtemel uyku düzensizliklerinin elimine edebileceği[306-308] ve bu ratlar üzerinde uykuyu düzenlemesinin stresin oluşturduğu davranışsal farklılıkları kısıtladığı düşünülebilir.

Periodontal kemik kaybı düzeyleri tüm gruplardaki ratların alt sağ çenelerinden mezio-distal yönde elde ettiğimiz histolojik seri kesitler üzerinde mine-sement birleşimi ile alveolar kemik ve furkasyon çatısı ile furkal alveolar kemik kreti arasındaki mesafe ölçümleri şeklinde analiz edildi. Karşılaştırmamızda referans olarak değerlendirdiğimiz kontrol grubunun aynı yaş ve kilo aralığında inbred yöntemle üretilen erkek ratlardan oluşması, periodontitise bağlı alveolar kemik kaybının fizyolojik sürme ve remodelinge bağlı değişikliklerden[283] kısmen izole olarak değerlendirilebilmesini sağlamıştır. Alveolar kemik yıkımı, inflamatuar periodontal hastalığın en karakteristik bulgusudur.[84]

Elde ettiğimiz bulgular, MSS-AK, FÇ-FAK parametrelerinin gruplar arasındaki anlamlılık değerleri açısından benzer olduğunu ve birbirine yakın şekilde dağıldığını

göstermiştir. S grubu, kontrol grubuna göre MSS-AK seviyeleri açısından anlamlı olmayan ($p>0.05$), FÇ-AK seviyeleri açısından anlamlı bir artış meydana getirmiştir ($p<0.05$). S-Mel grubu , S grubuna göre MSS-AK seviyeleri açısından anlamlı olmayan ($p>0.05$), FÇ-FAK seviyeleri açısından anlamlı bir düşüş meydana getirmiştir ($p<0.05$). DP grubu her iki parametre açısından da kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek tespit edilmiştir ($p<0.05$). Her iki parametre S-Dp grubunda, Dp grubuna göre anlamlı düzeyde artış gösterirken, S-Dp-Mel grubunda S-DP grubuna göre anlamlı düzeyde düşüş meydana gelmiştir ($p<0.05$).

Çalışmamızda alveolar kemik kaybının değerlendirildiği parametreler stresin tek başına uygulanmasıyla belirgin şekilde yükselmezken, deneysel periodontitis ve deneysel periodontitisin stres ile birlikte uygulandığı gruplarda arttığı melatonin uygulamasının ise çeşitli düzeylerde azalma sağladığı tespit edilmiştir. Bulgularımızı destekler şekilde Takada ve ark[15], histomorfometrik olarak ölçülen alveolar kemik kaybının, restraint stres uygulanmış deneysel periodontitis grubunda, deneysel periodontitis grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olduğunu göstermiştir. Nakajima ve ark.[16] , Peruzzo ve ark.[14], Takeda ve ark.[296] ve Gasperic ve ark.[299] ise histomorfometrik olarak ölçülen alveolar kemik kaybının tek başına restraint stres uygulanmış grupta kontrol grubuna göre anlamlı bir fark göstermediğini , deneysel periodontitis grubunda ve restraint stres uygulanmış deneysel periodontitis grubunda ise kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek bulunduğunu göstermiştir, ayrıca restraint stres uygulanmış deneysel periodontitis grubunun ,yalnızca deneysel periodontitisli gruba göre alveolar kemik kaybı seviyelerinin anlamlı düzeyde artış gösterdiğini tespit etmişlerdir.[14, 16, 296, 299] Bulgularımızdan farklı olarak Foureaux ve ark.[294] ise histomorfometrik olarak ölçülen alveolar kemik kaybının restraint stres uygulanan ve uygulanmayan gruplar arasında anlamlı bir fark göstermediğini, probiyotik kullanımının alveolar kemik kaybını anlamlı düzeyde sınırladığını rapor etmişlerdir.

Foureaux ve ark.[294]'dan farklı olan sonuçlarımızın, 2,5 saat/gün 30 gün boyunca uygulanan immobilizasyon stresinin, çalışmamızda uygulanan 12 saat/gün 35 gün boyunca uygulanan restraint strese göre hem stres türünün hem de maruz kalınan miktarının farklılık göstermesinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Sunulan bulgular, literatürdeki çalışmalarla benzer sonuçlara sahiptir.[14, 16, 296, 299] Yapılan çalışmaların çoğunluğunda belirtilen tek başına uygulanan stresin alveolar kemik kaybı açısından anlamlı bir fark oluşturmadığı sonucu çalışmamızda, S grubunda alveolar kemik kaybı açısından MSS-AK seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı bir değişim göstermemesi ($p>0.05$) yönüyle desteklenmiştir. Dp ve S-Dp gruplarında her iki parametre açısından kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde meydana gelen artışlar ($p<0.05$) ve S-DP grubunun her iki parametre açısından DP grubuna göre anlamlı olacak düzeyde yüksek olması ($p<0.05$) literatürdeki bahsedilen çalışmalardan[14, 16, 296, 299] elde edilen sonuçları desteklemektedir. S-Dp-Mel grubunda S-Dp grubuna göre meydana gelen anlamlı düzeydeki düşüş ($p<0.05$), melatoninin stresin deneysel periodontitis üzerinde oluşturduğu etkileri kısıtlamasıyla açıklanabilir.

Periodontal hastalığın önemli belirteçlerinden biri alveolar kemik kaybıdır, meydana gelen kaybın nasıl oluştuğu periodontitisin tedavisinin anlaşılması açısından oldukça önemlidir. İmmün sistemin, kemik yapım ve yıkım süreçleriyle olan bağlantısı 'osteoimmünoloji ' başlığı altında incelenmektedir. Yakın zamanda ortaya çıkan bu kavram periodontal hastalığın patogenezi açısında oldukça önemlidir. Periodontitiste görülen alveolar kemik kaybı sürecinin anlamlandırılmasında özellikle TNF reseptör ailesinin üç üyesi ön plana çıkmaktadır; NF-κβ'nın reseptör aktivatörü (RANK), ligandı (RANKL) ve RANKL'ı inhibe eden OPG'dir.[84, 85]

Osteoklast öncü hücrelerinin yüzeyinde bulunan RANK reseptörüne bağlanan RANKL, bu bağlanmayla birlikte osteoklastın aktivasyonunu ve olgunlaşmasını

gerçekleştirir.[309] Osteoprotegerinin kemik yapım yıkım metabolizmasındaki görevi ise olgun osteoklast hücrelerinin oluşmasını engellemek amacıyla RANKL'ın RANK reseptörüne bağlanmasını engellemektir. Osteoblastlar tarafından salgılanan OPG RANK reseptörüne bağlanma açısından RANKL'a göre yüksek afiniteye sahiptir. OPG'nin bu özelliği kemik yıkım sürecini engellemektedir.[88]

Alveolar kemik kaybında RANKL ve OPG seviyelerinin değişimi tek başına değerlendirilebilirken, RANKL/OPG oranındaki değişim de periodontal hastalıkta alveolar kemik kaybının değerlendirilmesinde önemli bir parametredir.[87, 310-313]Doku üzerinde yapılan çalışmalarda [310, 313] alveolar kemik kaybının arttığı durumlarda RANKL seviyelerinin artış [310, 313] gösterdiği ve OPG düzeylerinin azaldığı [310, 313] gösterilmiştir. RANKL ve OPG düzeyleri ve ilişkili olarak da meydana gelen kemik kayıpları çeşitli antioksidan ajanların sistemik olarak uygulanması yoluyla engellenebilmektedir.[173, 314-316]

Histolojik incelemeler kemiğin yapısının dahası RANKL ve OPG'nin incelemesinde oldukça yaygın kullanılan bir yöntemdir. Alveolar kemik kaybını yorumlayabilmek için histolojik kesitlerde RANKL ve OPG boyanma alanı ve yoğunluğu esas alınmaktadır. Hücrelerin histolojik kesitlerdeki ekspresyon derecesi boyanma yoğunluğu "intensity" olarak isimlendirilirken, boyanma alanı ise kesitlerdeki sınırları belirli bir alanda bulunan ekspresyon yapan hücre sayısını belirtmektedir.[317] Boyanma yoğunluğu değerlendirmesi bilgisayar ortamında yazılım aracılığıyla gerçekleştirilirken, boyanma alanı ölçümü ise araştırıcının boyanan hücreleri tek tek belirleyerek sayısal değerleri kayıt altına almasıyla belirlenmektedir. Boyanma alanı daha kolay uygulanan bir teknik olması nedeniyle yaygın bir şekilde tercih ediliyorken boyanma yoğunluğu değerlendirmesi daha ayrıntılı bilgi vermekte ancak daha fazla zaman almaktadır.[317]

Çalışmamızda histolojik kesitlerin incelenmesinde boyama alanı yöntemi tercih edilmiştir.[270, 271]

Sunulan bulgularda, RANKL, OPG, RANKL/OPG seviyeleri birbirleriyle uyumlu şekilde gruplar arasında dağılmıştır. RANKL ve RANKL/OPG seviyeleri S grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olmayan hafif bir artış meydana getirirken ($p>0.05$), S-Mel grubu S grubuna göre anlamlı olmayan hafif bir düşüş sağlamıştır ($p>0.05$). Dp grubu, RANKL ve RANKL/OPG seviyelerini kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yükseltmiş ($p<0.05$), S-Dp grubu ise Dp grubuna göre RANKL ve RANKL/OPG seviyelerini anlamlı düzeyde arttırmıştır. ($p<0.05$). S-Dp-Mel grubunda, S-Dp grubuna göre RANKL seviyeleri açısından anlamlı, RANKL/OPG seviyeleri açısından anlamlı olmayan bir düşüş meydana gelmiştir ($p>0.05$).

OPG seviyeleri S grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olmayan hafif bir düşüş meydana getirirken ($p>0.05$), S-Mel grubu S grubuna göre anlamlı olmayan hafif bir artış sağlamıştır ($p>0.05$). Dp grubu, OPG seviyesini kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşürmüş ($p<0.05$), S-Dp grubu ise Dp grubuna göre anlamlı olmayan düzeyde düşüş sağlamıştır ($p>0.05$). S-Dp-Mel grubunda S-Dp grubuna göre OPG seviyeleri açısından anlamlı düzeyde bir artış sağlamıştır ($p<0.05$).

Çalışmamızda RANKL, RANKL/OPG parametrelerinin stresin tek başına uygulanmasıyla hafif bir şekilde yükseldiği, deneysel periodontitis ve deneysel periodontitisin stres ile birlikte uygulandığı gruplarda belirgin şekilde arttığı, melatonin uygulamasının ise çeşitli düzeylerde azalma sağladığı tespit edilmiştir. OPG düzeyi ise RANKL'ın aksine stresin tek başına uygulanmasıyla hafif bir şekilde azaldığı, deneysel periodontitis ve deneysel periodontitisin stres ile birlikte uygulandığı gruplarda belirgin şekilde azaldığını, melatonin uygulamasının ise çeşitli düzeylerde artış sağladığı tespit edilmiştir. Sunulan bulgular, literatürdeki çalışmalarla kısmen uyumlu olup stres ilişkili

periodontitisli ratlarda RANKL, OPG ve RANKL/OPG parametrelerinin değerlendirildiği çalışmalar açısından incelendiğinde; Peruzzo ve ark.[14] periodontal dokulardan alınan örnekler üzerinde yaptığı polimeraz zincir reaksiyonu ile belirledikleri RANKL, OPG seviyelerini incelemişlerdir. Periodontitisli ratların ve restraint stres uygulanmış periodontitisli ratların, kontrol grubuna göre RANKL seviyelerinde anlamlı olacak düzeyde artış meydana geldiğini ve restraint stres uygulanmış periodontitisli ratların, periodontitisli ratlara göre RANKL seviyelerinde anlamlı olacak düzeyde artış olduğunu bildirmişlerdir. OPG seviyeleri açısından incelendiklerinde restraint stres uygulanmış periodontitisli ratların kontrol ve deneysel periodontitis grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olduğunu, kontrol ve deneysel periodontitis gruplarının arasında anlamlı bir fark olmadığını rapor etmişlerdir. RANKL/OPG oranını ise restraint stres uygulanmış periodontitisli ratlarda, kontrol ve deneysel periodontitis grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek tespit etmişler , kontrol ve deneysel periodontitis gruplarının arasında ise anlamlı bir fark olmadığını rapor etmişlerdir. Foureaux ve ark.[294] RANKL seviyeleri açısından deneysel periodontitis oluşturulan her grupta ,oluşturmayanlara göre anlamlı bir artış bulunduğunu, probiyotik kullanımının ya da immobilizasyon stresinin RANKL seviyeleri açısından anlamlı bir fark oluşturmadığını göstermiştir. OPG seviyeleri açısından ise immobilizasyon stresi uygulanan gruplarla uygulanmayan gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamış, probiyotik kullanılmış deneysel periodontitisli ratların, probiyotik kullanmayan ratlara göre anlamlı düzeyde yüksek OPG seviyelerine sahip olduğu gösterilmiştir.

Çalışmamızda elde edilen bulgular, RANKL seviyesinin Peruzzo ve ark[14]'nın sonuçlarına benzer şekilde Dp ve S-Dp gruplarının kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olduğunu, S-Dp grubunun da Dp grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olduğunu göstermiştir ($p<0.05$). S-Dp-Mel grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir artış

gözlensede, Peruzzo ve ark.[14]'nın çalışmasından farklı olarak uygulanan melatonin etkisiyle, S-Dp-Mel grubunda Dp ve S-Dp gruplarına RANKL seviyesi açısından anlamlı bir düşüş sağlamıştır ($p<0.05$).

Elde edilen bulgular , OPG seviyesinin Peruzzo ve ark.[14]'ın sonuçlarından farklı olarak S-DP ve Dp gruplarının kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşük olduğunu göstermiştir ($p<0.05$). Ayrıca OPG seviyesinde S-Dp-Mel grubunda S-DP grubuna göre, S-Mel grubunda ise S grubuna göre meydana gelen anlamlı düzeydeki($p<0.05$) artışlar melatonin stresin oluşturduğu etkileri kısıtlaması ile ilgili olduğuna kanıt olarak gösterilebilir.

Elde edilen bulgular, RANKL/OPG seviyesinin Peruzzo ve ark.[14]'ın sonuçlarına benzer şekilde Dp ve S-Dp gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olduğunu, S-Dp grubunun Dp göre anlamlı düzeyde yüksek olduğunu göstermiştir($p<0.05$). S-Dp-Mel grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olmayan hafif bir artış gözlensede ($p>0.05$), Peruzzo ve ark.[14] çalışmasından farklı olarak uygulanan melatonin etkisiyle, S-Dp-Mel grubunda Dp ve S-Dp gruplarına göre RANKL/OPG seviyesi açısından anlamlı bir düşüş sağlamıştır ($p<0.05$).

Foureaux ve ark.[294] yaptığı çalışmada, uygulanan immobilizasyon stresinin kortikosteron seviyelerini anlamlı düzeyde arttırıp, RANKL,OPG ve alveolar kemik kaybı açısından anlamlı bir fark oluşturmaması çalışmamızda elde edilen bulgularla uyuşmamaktadır. Bu uyuşmazlık 2,5 saat/gün 30 gün boyunca uygulanan immobilizasyon stresinin, çalışmamızda uygulanan 12 saat/gün 35 gün boyunca uygulanan restraint strese göre hem stres türünün hem de maruz kalınan miktarının farklılık göstermesinden kaynaklanıyor olabilir. Foureaux ve ark.[294]'nın yaptığı çalışmada, tek başına uygulanan deneysel periodontitisin RANKL , OPG ve alveolar kemik kaybı üzerine olan etkileri açısından çalışmamızla uyumluluk göstermektedir.

Çalışmamızda restraint stresle birlikte RANKL seviyeleri artmış ve OPG seviyeleri azalmıştır. HPA aksının uyarılması sonucu artması beklenen katekolaminler, glukokortikoid hormonu ve dolayısıyla kortizol [201, 202] , kortikosteron parametresinde elde edilen sonuçlarla uyumluluk göstermektedir. Strese cevap olarak artan glukokortikoidin, NF-KB'nin aktivasyonunu arttırarak RANK sinyali yoluyla kemik yıkımına katkıda bulunabileceğini [261, 262] ayrıca stromal ve osteoblastik hücre dizisinde RANKL ekspresyonunu arttırdığı ve OPG ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir.[263, 264] Bulgularımızda her ne kadar incelenmemiş olsada, HPA aksının artışıyla beraber artacağını öngördüğümüz katekolaminlerin, osteoblastlar ve osteoklastlar üzerindeki ß-adrenerjik reseptör aktivasyonunu sağladığı ve RANKL ekspresyonunu artırarak osteoklast farklılaşmasına neden olduğu gösterilmiştir [262, 265] Bulgularda stresle birlikte artışı gösterilen IL-1ß, RANKL ekspresyonunu arttırıp ve OPG yapımını azaltan bir sitokindir. [89] Çalışmamız bahsedilen mekanizmalara uygun sonuçlar göstermektedir, Melatonin uygulanan gruplarda ise stresin RANKL ve OPG üzerine oluşturduğu etkilerinin kısıtlanması, melatoninin HPA aksının aktivasyonunu inhibe ederek, glukokortikoid hormonu dolayısıyla kortizolü ve katekolaminlerin salınımını, kısıtlamasıyla ilişkili olabilir.[256-259]

Yapılan çalışmada doku sitokin (IL-1, IL-10) ve MMP (MMP-8, MMP-9) tayini için sandviç ELISA yöntemi kullanılmıştır. Sitokinlerin ve MMP'lerin tayininde immünoassay teknikleri, biyoassay tekniklerine kıyasla kolaylık, hassasiyet, özgüllük ve duyarlılık açısından avantajları dolayısıyla tercih edilirler. Enzim temelli kantitatif immünoassay yöntemi olan ELISA 1971 yılından beri geliştirilerek günümüzde hala tercih edilmektedir. Sandviç ELISA yöntemi teknik, özgüllük ve hassasiyet bakımından avantajlıdır.[318] Çalışmamızda sandviç ELISA tekniğini tercih etmemizin nedeni

uygulama kolaylığı ve hassasiyet yönünden amacımıza hizmet edecek ticari kitin piyasadan kolaylıkla temin edilebilmesidir.

Sunulan hayvan çalışmasında diş eti dokusundaki inflamatuar cevabı belirlemek için IL-1β,IL-10, IL-1β/IL-10 sitokin belirteçleri kullanılmıştır. Sitokinler, bakteriyel plağa karşı oluşan immün cevapla karakterize periodontal hastalık mekanizmasının tüm safhalarında kilit rol oynarlar.IL-10 periodontal hastalık süreçlerinde antiinflamatuar bir rol üstlenip, mevcut alveolar kemik miktarının korunmasında osteoklastların aktive olmasını engelleyerek ve osteoblastların ürettiği kemik miktarını kontrol ederek ederek etkili olur.[117] IL-1β ise proinflamatuar sitokin olup, alveolar kemik rezorpsiyonu da dahil olmak üzere periodontal yıkım sürecinde olumsuz etkiler meydana getirir.[319, 320]

Elde ettiğimiz bulgular IL-1ß, IL-10, IL-1ß / IL-10 seviyelerinin birbirleriyle uyumlu olacak şekilde gruplar arasında dağıldığını göstermektedir. IL-1ß seviyeleri, S grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olmayan düzeyde hafif bir artış gösterirken, S-Mel grubunda S grubuna göre anlamlı olmayan hafif bir düşüş göstermiştir ($p>0.05$). Dp grubu, IL-1ß seviyelerinde kontrol ve S grubuna göre anlamlı olmayacak düzeyde hafif bir artış sağlamıştır ($p>0.05$). S-Dp grubu, IL-1ß seviyelerini kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde ($p<0.05$), S ve Dp gruplarına göre anlamlı olmayan düzeyde arttırmıştır ($p>0.05$). S-Dp-Mel grubunda S-Dp grubuna göre IL-1ß seviyelerinde anlamlı olmayan düzeyde hafif bir düşüş meydana gelmiştir ($p>0.05$).

IL-10 seviyeleri S grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı olmayan hafif bir düşüş gösterirken, S-Mel grubunda , S grubuna göre anlamlı olmayan düzeyde hafif bir artış göstermiştir ($p>0.05$). Dp grubu, IL-10 seviyelerini kontrol ve S gruplarına göre anlamlı olmayan düzeyde düşürmüş, S-Dp grubuna göre ise anlamlı olmayan düzeyde yükseltmiştir ($p>0.05$). S-Dp-Mel grubunda S-Dp grubuna göre IL-10 seviyeleri açısından anlamlı olmayan hafif bir artış meydana gelmiştir ($p>0.05$).

IL-1ß / IL-10 seviyeleri, S grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı olmayan düzeyde hafif bir artış gösterirken, S-Mel grubunda S grubuna göre anlamlı olmayan hafif bir düşüş göstermiştir ($p>0.05$). Dp grubu kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde bir artış meydana getirmiştir ($p<0.05$). S-Dp grubu, Dp grubuna göre IL-1ß / IL-10 seviyelerinde anlamlı olmayan hafif bir artış meydana getirmiştir ($p>0.05$). S-Dp-Mel grubunda S-Dp grubuna göre IL-1ß / IL-10 seviyelerinde anlamlı olmayan düzeyde hafif bir düşüş tespit edilmiştir ($p>0.05$). Çalışmamızda IL-1ß parametrelerinin, tek başına restraint stres uygulanmasıyla ya da tek başına deneysel periodontitis uygulanmasıyla hafif bir şekilde yükseldiği, deneysel periodontitisin stres ile birlikte uygulandığı gruplarda belirgin şekilde arttığı, melatonin uygulamasının ise çeşitli düzeylerde azalma sağladığı tespit edilmiştir. IL-10 parametresinin ise restraint stresin ve deneysel periodontitisin birlikte veya ayrı ayrı uygulandığı gruplarda hafifçe azaldığını, melatonin uygulamasının ise çeşitli düzeylerde artış sağladığı tespit edilmiştir. IL-1ß / IL-10 parametresinin ise stresin tek başına uygulanmasıyla hafif bir şekilde yükseldiği, deneysel periodontitis ve deneysel periodontitisin stres ile birlikte uygulandığı gruplarda belirgin şekilde arttığı, melatonin uygulamasının ise çeşitli düzeylerde azalma sağladığı tespit edilmiştir. Sunulan bulgular literatürdeki çoğu çalışmaya benzer olup stres ilişkili periodontitisli ratlarda sitokin değişimlerinin değerlendirildiği çalışmalar açısından incelendiğinde; Peruzzo ve ark.[14]'ın gingival dokulardan alınan örnekler üzerinde yaptığı polimeraz zincir reaksiyonu ile belirledikleri IL-1ß ve IL-10 seviyelerinin periodontitisli ratlarda ve restraint stres uygulanmış periodontitisli ratlarda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olduğunu göstermiş, restraint stres uygulanmış periodontitisli ratlarda ise periodontitisli ratlara göre anlamlı düzeyde yüksek olduğunu bildirmiştir. Peruzzo ve ark. ayrıca IL-1a'nın reseptör antagonisti olan IL-1ra ve proinflamatuar sitokin olan IL-6 seviyelerini de incelemişlerdir. IL-1ra seviyesi kontrol grubunda ve yalnızca periodontitisli ratlarda,

restraint stres uygulanmış periodontitisli ratlara göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. IL-6 seviyeleri ise restraint stres uygulanmış periodontitisli ratlarda, kontrol grubu ve yalnızca periodontitisli ratlara göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur.

Bulgularımız Peruzzo ve ark.[14]'ın çalışmalarıyla proinflamatuar sitokin olan IL-1ß seviyeleri yönüyle benzerlik gösterip, IL-1ß seviyeleri S-Dp grubunda Kontrol grubuna göre anlamlı($p<0.05$), Dp grubuna göre ise anlamlı olmayan ($p>0.05$) hafif bir artış göstermiştir. Peruzzo ve ark.'dan farklı olarak uygulanan melatonin etkisiyle, S-Dp-Mel grubunda S-DP grubuna göre, S-Mel grubunda ise S grubuna göre IL-1ß seviyelerinde anlamlı olmayan hafif bir düşüş sağlamıştır ($p>0.05$).

Bulgularımız Peruzzo ve ark.[14]'ın çalışmalarıyla antinflamatuar sitokin IL-10'un seviyeleri yönüyle farklılık gösterip, S-DP grubu kontrol grubuna göre anlamlı($p<0.05$), Dp grubuna göre ise anlamlı olmayan ($p>0.05$) bir düşüş göstermiştir. Peruzzo ve ark.'nın çalışmasından farklı olarak uygulanan melatonin etkisiyle, S-Dp-Mel grubunda S-DP grubuna göre, S-Mel grubunda ise S grubuna göre IL-10 seviyelerinde anlamlı olmayan hafif bir yükseliş sağlamıştır.

Rettori ve ark.[298]'nın gingival dokulardan alınan örnekler üzerinde yaptığı polimeraz zincir reaksiyonu ile belirledikleri IL-1ß seviyeleri restraint uygulanan periodontitisli ratlarda ve yalnızca periodontitisli ratlarda , hem kontrol hem de restraint stres grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Periodontitisli ratlar arasında ise restraint stres uygulanan grubun uygulanmayan gruba göre anlamlı olmayacak hafif bir yükseliş gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bulgularımızda IL-1ß seviyeleri S-Dp grubunda kontrol grubuna göre anlamlı($p<0.05$), Dp grubuna göre ise anlamlı olmayan ($p>0.05$) hafif bir artış göstermiştir Çalışmamızda bu yönüyle benzer sonuçlar elde etmemizin yanında farklı olarak uygulanan melatonin etkisiyle, S-Dp-Mel

grubunda S-DP grubuna göre, S-Mel grubunda ise S grubuna göre IL-1ß seviyeleri açısından anlamlı olmayan hafif bir düşüş sağlamıştır ($p>0.05$).

Nakajima ve ark.[16]'ın gingival dokulardan alınan örnekler üzerinde yaptığı polimeraz zincir reaksiyonu ile belirledikleri IL-1ß seviyelerinin restraint stres ve restraint stres uygulanmış periodontitisli gruplarda , kontrol ve yalnızca periodontitisli gruplara göre anlamlı düzeyde düşük olduğu bildirilmiştir. Çalışmamız bu sonuçlara göre farklılık göstermektedir. Nakajima ve ark.[16]'ın IL-1ß seviyelerinin restraint stres uygulaması ile düştüğünü gösteren çalışması stresin HPA aksını uyardıktan sonra meydana gelen kortizol salınımının henüz ilgili reseptörlerde desentizasyon meydana getirmemesi sonucu immün yanıtın ve IL-1ß üretiminin baskılanması ile ilgili olabilir.[7, 21]

Bulgularımızda, restraint stres uygulamasının IL-1ß seviyelerinin artışına, IL-10 seviyelerinin azalmasına sebep olmuştur. IL-1ß seviyelerinin artışı bazı mekanizmalarla açıklanmaktadır: stres cevabı olarak aktive olan HPA aksı, böbreküstü bezinin korteksinden glukokortikoid hormon salınımını teşvik eder. Suprarenal bölgeden salgılanan glukokortikoid salınımını arttırdığı kortizolün etkisiyle proenflamatuvar sitokinlerin (interlökinler ,prostoglandinler ,tumor nekroz faktör) üretimini azaltır ve immünsüpresif bir etki oluşturur.[201, 202] Oluşan stresin kronikleşmeye başlamasıyla yüksek düzeyde salınan kortizol, akut stres durumdaki immünsüpresif fonksiyonunun aksine reseptörlerde oluşan rezistans sebebiyle immün yanıtı regüle edemez ve proinflamatuar sitokinlerin (IL-1ß) aşırı salınımı ile karakterize yıkıcı konak yanıtını şiddetlenir.[7, 10, 21] Bir başka mekanizma ise stresin, duyusal sinir liflerinden nöropeptid salınımını tetiklemesi ve proinflamatuar sitokin (IL-1ß) üretiminde artış meydana gelmesi sonucu IL-1ß seviyesi yükselmiş olabilir.[203] Ayrıca restraint stresin ratlar

üzerinde oluşturduğu muhtemel uyku bozuklukları sonucu da IL-1ß seviyelerinde artış meydana gelmiş olabilir.[10, 260]

IL-10 seviyesindeki stresle meydana gelen azalmalar ise inflamatuar kaskadı baskılayarak, Growth Factor (TGF)-BL ve Interlökin (IL)-10'u üreten Düzenleyici T hücrelerinin (T reg'ler) depresyon ve stres gibi durumlarda proinflamatuar T hücrelerine göre azalma göstermesinden kaynaklanıyor olabilir.[10, 321]

Çalışmamız bahsedilen mekanizmalara uygun sonuçlar göstermektedir, Melatonin uygulanan gruplarda ise stresin IL-1ß, IL-10 üzerine oluşturduğu etkilerinin kısıtlanması, melatoninin HPA aksının aktivasyonunu inhibe ederek, glukokortikoid hormonu dolayısıyla kortizolü salınımını, baskılamasıyla ilişkili olabilir.[256-259]

Matrisinler olarak da adlandırılabilen matriks metalloproteinazlar ZN ve Ca bağımlı enzimlerdir. Bu enzimler ekstrasellüler matriksin neredeyse bütün bileşenlerini bozabilir buna bağlı olarak birçok fizyolojik ve patolojik olayda önemli bir rol oynar.[120] MMP ve doku inhibitörleri TIMP'ler peridontal dokulardaki fizyolojik değişiklikler ve doku yıkımında merkezi bir role sahiptirler.[125] Periodontitis sürecinde MMP ve TIMP(TIMP-1) arasındaki dengenin MMP yönünde bozulması doku yıkımıyla sonuçlanır.[125] Herhangi bir patolojik durum bulunmayan periodontal dokularda fibroblast tarafından üretilen MMP'ler (MMP-1 ya da kollajenaz-1) periodontal bağ dokusu hücrelerinin ECM devamlılığını sağlamada görevlidirler. Periodontal hastalık durumunda ise meydana gelen enflamasyon ile MMP üretiminde artış meydana gelir ve sağlıklı durumun aksine MMP üretimi fibroblast yerine enflamatuvar hücreler tarafından (özellikle nötrofil) yapılır.[78, 126] Periodontal doku yıkımında MMP'ler büyük bir role sahiptir.Hastalığın ilerlemesiyle birlikte periodontal dokulardaki MMP-8 ve MMP-9 seviyesinde artış gözlenir.[130] Periodontal hastalığın şiddetini ,ilerleme hızını ve tedavi

yanıtını en iyi yansıtan ve periodontal dokularda en fazla gözlenen MMP elemanları MMP-8 ve MMP- 9' dur.[131]

Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular, MMP-8 ve MMP-9 parametreleri açısından benzerlik göstermektedir. MMP-8 ve MMP-9 seviyeleri S grubunda, kontrol gruplarına göre anlamlı olmayan hafif bir artış göstermiştir ($p>0.05$) . Dp grubu MMP-8 seviyesi açısından Kontrol grubuna göre anlamlı olmayan hafif bir artış meydana getirirken ($p>0.05$) , MMP-9 seviyesi açısından kontrol grubuna göre anlamlı bir artış meydana getirmiştir ($p<0.05$). S-Dp grubunda, Dp grubuna göre MMP-8 seviyesi açısından anlamlı ($p<0.05$), MMP-9 seviyesi açısından anlamlı olmayan düzeyde bir artış meydana gelmiştir ($p>0.05$). Melatoninin etkisiyle, S-Mel grubunda S grubuna göre MMP-8 ve MMP-9 seviyeleri açısından anlamlı olmayan hafif bir düşüş meydana gelmiştir ($p>0.05$), S-Dp-Mel grubunda S-Dp grubuna göre MMP-9 seviyesinde anlamlı olmayan($p>0.05$) , MMP-8 seviyesinde anlamlı bir düşüş görülmüştür ($p<0.05$).

Literatürde stres ilişkili periodontitisin, periodontal dokular üzerinde oluşturduğu MMP seviyesi değişikliklerini inceleyen bir hayvan çalışması bulunmamaktadır. Çalışmamız bu yönüyle ilk olma özelliğini taşımaktadır. Johansen ve ark.[322] gingival enflamasyonlu, stres ilişkili depresyon geçiren 43 kadın hasta üzerinde yaptıkları çalışmada stresin dişeti oluğu sıvısındaki MMP-9 seviyesi üzerinde anlamlı herhangi bir değişiklik meydana getirmediğini bildirmiştir. Yang ve ark.[323] stres ile ilişkili 31 kadın ,20 erkek kullanılarak yara modelleri üzerinde yaptığı çalışmada MMP-8 ve MMP-9 seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı bir fark göstermediği bildirilmiştir. Bosse ve ark.[324] astım hastalığına bağlı olarak kortizol tedavisi gören, ek olarak kronik inflamatuar rahatsızlığı olan hastalarda, serum MMP-9 seviyesinin kontrol gruplarına göre anlamlı bir farklılık oluşturmadığını bildirmiştir.

Sunulan bulgular tek başına uygulanan restraint stresin MMP-8 ve MMP-9 seviyeleri açısından kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık sağlayamaması ($p>0.05$) yönüyle literatür ile uyumludur. Bulgularımızda Johansen ve ark.[322]'nın aksine , Dp'li ratlardaki stres ilişkili MMP düzeyi artışlarının yine bulgularımızda tespit etttiğimiz sitokin düzeyi değişiklikleri ile ilişkili olduğu düşüncesindeyiz. IL-1ß 'nın MMP-8, MMP-9 gen transkripsiyonunu kontrol ettiği pek çok çalışmada açıkça gösterilmiştir. [325-327] S-Mel grubunda S grubuna göre MMP-8 ve MMP-9 seviyeleri açısından anlamlı olmayan hafif bir düşüş ($p>0.05$) ve S-Dp-Mel grubunda S-Dp grubuna göre MMP-9 seviyesinde anlamlı olmayan ($p>0.05$), MMP-8 seviyesinde anlamlı ($p<0.05$) düşüşlerin stresin periodontitis üzerinde oluşturduğu etkilerin melatonin ile kısıtlanması sonucu meydana geldiği düşünülmektedir.

Sunulan hayvan çalışmasında gingival dokulardaki oksidatif durumu incelediğimiz belirteçler MDA, GSH ,TOD,TAOK, OSİ idi. MDA, bir oksidatif hücre membran hasarı belirtecidir, en sıklıkla yararlanılan oksidatif stres belirteçlerinden birisi olup membran fosfolipitlerindeki oksidatif hasar düzeyi hakkında bilgi vermektedir. MDA oluştuktan sonra kolayca diffüze olup membran yapısındaki lipid ve proteinlere çapraz bağlanarak membran bütünlügünü bozar, bu da membran permeabilitesinin bozulmasına neden olur.

GSH ise temel hücre içi antioksidan olarak kabul edilmektedir. Hücresel oksidatif hasarın inhibisyonunda önemli bir role sahiptir.[328] Oksidatif stres düzeyinin değerlendirilmesinde MDA ve 8-hidroksideoksi-guanozin (8-OHdG), oksidatif DNA hasarı belirteci, gibi spesifik oksidatif yıkım ürünleri değerli bilgiler sağlıyor ise de dokudaki nihai oksidatif durumu yansıtmakta ne yazık ki yetersiz kalmaktadır. Benzer şekilde, belli enzimatik veya non enzimatik antioksidan düzeylerine yönelik ölçümler de total antioksidan etkinliği net olarak yansıtamamaktadır. Güncel çalışmalar TOD ve

TAOK ölçümlerinin nihai oksidatif ve antioksidan durumları daha açık bir şekilde ortaya koyduğunu rapor etmektedirler. Dahası, pratik ve güvenilir bir yöntem olan TAOK'un, bilindik antioksidanların yanı sıra henüz keşfedilmemiş antioksidanların etkilerini de yansıttığı bildirilmektedir. OSİ, TOD ile TAOK arasındaki oransal bir değerdir ve oldukça geçerli bir parametredir. Oksidatif stres düzeyini daha net ve pratik bir şekilde ortaya koymak amacı ile Erel[166] tarafından önerilmiştir. Hem ROT üretimi hem de antioksidan durumdan direkt olarak etkilenmektedir.[166]

ROT, serbest oksijen radikalleri ve hücre içi, hücre dışı radikal oluşturma potansiyeline sahip olan reaktif moleküllerin tamamını kapsayan genel bir ifadedir.[177] Antioksidan savunma sistemi ise ROT'un olası olumsuz etkilerine yönelik bütün yaşayan organizmalarda bulunan koruyucu bir mekanizmadır[158] Oksidatif stres, ROT ve antioksidan sistemin arasındaki dengenin ROT lehine bozulmasıyla meydana gelir[178].Oksidatif stres hücreler üzerinde lipid peroksidasyonu, oksidasyon sonucu protein yapılarda yıkım, ECM'nin polarize yapısının bozulması, proenflamatuvar sitokinlerin üretiminin arttırılması ,kalıcı etkilere sahip olan DNA hasarı gibi durumlara sebep olur.[179] ROT canlıda birçok fizyolojik mekanizmaya dahil olurken, içinde periodontal hastalıkların da bulunduğu kronik enflamatuar hastalıkların patogenezinde önemli bir rol oynamaktadır.[180] ROT kaynaklı oksidatif hasar diş eti dokusu, periodontal ligament ve alveolar kemik gibi periodontal dokularda görülür.[183] Periodontitiste oluşan oksidatif stres, periodontal dokularda sınırlı kalmayıp sistemik olarak etki eden ROT'lara , membran lipitlerinde geri dönüşümsüz olarak meydana gelen lipit peroksidasyonuna ve protein yapıların oksidasyonuna sebep olur.Hastalık sürecinde toplam antioksidan kapasitede kayıp görülür. Tüm bunlar göz önüne alındığında oksidatif stresin periodontitis patogenezindeki önemi görülmektedir. Periodontal dokularda meydana gelen harabiyetin seviyesi oksidatif stresle bağlantılıdır.[81, 175, 185]

Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular MDA, GSH, TOD, TAOK, OSİ parametreleri açısından değerlendirildiğinde: MDA ve TOD parametreleri gruplar arasında ortaya çıkan anlamlılık değerleri açısından aynı bulunmuştur. S grubunda TOD ve MDA seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde etkilenmemiş olsa da hafif bir artış göstermiştir ($p>0.05$), S-Mel grubunda, S grubuna göre TOD ve MDA seviyelerinde anlamlı olmayan hafif bir düşüş meydana gelmiştir ($p>0.05$). Dp grubunda MDA ve TOD seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı olacak düzeyde yüksek tespit edilmiştir ($p<0.05$). S-Dp grubunda, Dp grubuna göre MDA ve TOD seviyeleri anlamlı olmayacak düzeyde hafif bir yükseliş gösterirken ($p>0.05$), S-DP-Mel grubunda S-DP grubuna göre anlamlı düzeyde bir düşüş meydana gelmiştir ($p<0.05$).

TAOK ve GSH parametreleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılıklar oluşmasa da bu iki parametre hem birbirine benzer şekilde dağılmıştır. S grubunda TAOK ve GSH seviyeleri, kontrol grubuna göre anlamlı olmayan düzeyde hafif bir düşüş gösterirken ($p>0.05$), S-Mel grubunda S grubuna göre TAOK ve GSH seviyeleri anlamlı olmayan düzeyde hafif bir artış göstermiştir ($p>0.05$). İlginç bir şekilde Dp grubunda kontrol grubuna göre, TAOK ve GSH seviyeleri anlamlı olmayan hafif bir artış göstermiştir ($p>0.05$). Bununla birlikte S-Dp grubu Dp grubuna göre TAOK ve GSH seviyelerinde anlamlı olmayacak düzeyde hafifçe bir düşüş göstermiştir ($p>0.05$). S-DP-Mel grubunda ise S-DP grubuna göre anlamlı olmayan hafif bir artış meydana gelmiştir ($p>0.05$) .

OSİ parametresi TOD ve MDA parametrelerine benzer dağılım göstermiştir. S grubunda OSİ seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde etkilenmemiş olsada hafif bir artış göstermiştir ($p>0.05$), S-Mel grubunda, S grubuna göre OSİ seviyelerinde anlamlı olmayan hafif bir düşüş meydana gelmiştir ($p>0.05$). Dp grubunda OSİ seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı olmayan düzeyde yüksek tespit edilmiştir ($p>0.05$). S-Dp

grubunda, Dp grubuna göre OSİ seviyeleri anlamlı olacak düzeyde yükseliş gösterirken ($p<0.05$), S-DP-Mel grubunda S-DP grubuna göre anlamlı düzeyde bir düşüş meydana gelmiştir ($p<0.05$). Çalışmamızda oksidatif parametrelerin, restraint stres ve deneysel periodontitis uygulanmasıyla yükseldiğini, melatonin uygulamasının ise çeşitli düzeylerde azalma sağladığı tespit edilmiştir. Antioksidan parametrelerin ise genel olarak restraint stres ve deneysel periodontitis uygulanmasıyla düştüğünü, melatonin uygulamasının ise çeşitli düzeylerde artış sağladığı tespit edilmiştir. Literatürde stres ilişkili periodontitisin, periodontal dokular üzerinde oluşturduğu oksidatif stres parametrelerindeki değişiklikleri inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Bu bakımdan literatür, deneysel stres ilişkili oksidatif stres parametrelerini inceleyen çalışmalar açısından değerlendirilmiştir. Lin ve ark.[289] restraint stres uygulanmış ratların intestinal mukozasında meydana gelen oksidatif stres değişikliklerini değerlendirdikleri çalışmasında ; ROT ve MDA seviyelerinin restraint stres uygulanan grupta, kontrol grubuna göre anlamlı olacak düzeyde yüksek olduğunu tespit etmişlerdir, melatonin ve restraint stres uygulanan grupta ROT ve MDA seviyelerinin yalnızca restraint stres uygulanan gruba göre anlamlı bir düşüş gösterdiğini bildirmişlerdir. SOD (süperoksitdismutaz), TAOK, GSH-px seviyelerinin ise yalnızca restraint stres uygulanan grupta diğer gruplara göre anlamlı düzeyde düştüğünü, restraint stres ile birlikte melatonin uygulanan grupta ise kontrol grubuna göre anlamlı olmayan düzeyde bir artış meydana geldiğini bildirmişlerdir. Zhang ve ark.[329] restraint stres uygulanmış ratların hipokampüs dokusu üzerinde meydana gelen oksidatif stres değişikliklerini değerlendirdikleri çalışmasında ; ROT, MDA ve H_2O_2 seviyelerinin yalnızca restraint stres uygulanan grupta, kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artış gösterdiğini, SOD , TAOK, GSH-px seviyelerinin ise yalnızca restraint stres uygulanmış grupta Kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşüş gösterdiğini bildirmişlerdir. D'Amico[302] ve ark.

restraint stres uygulanmış ratların ileum dokusu üzerinde meydana gelen oksidatif stres değişikliklerini değerlendirdikleri çalışmasında ; MDA seviyelerinin yalnızca restraint stres uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde bir artış gösterdiğini bildirmişlerdir.

Literatürdeki çalışmalarda[289, 302, 329], uygulanan restraint stresin, oksidatif stresi gösteren parametreler açısından kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olması çalışmamızda elde edilen, S grubunun TOD ve MDA seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı olmayan düzeyde hafif bir artış göstermesi ($p>0.05$), S-Dp grubunun, Dp grubuna göre MDA ve TOD seviyelerinde anlamlı olmayacak düzeyde hafif bir artış göstermesi ($p>0.05$) bulgularıyla kısmen benzerlik göstermektedir. Ayrıca S-DP-Mel grubunda S-DP grubuna göre TOD ve MDA seviyelerinde anlamlı düzeyde bir düşüş meydana gelmesi ($p<0.05$) , S-Mel grubunda, S grubuna göre TOD ve MDA seviyelerinde anlamlı olmayan hafif bir düşüş meydana gelmesi ($p>0.05$) Lin ve ark.[289]'ın melatoninin restraint stresin sebep olduğu oksidatif stresi kısıtladığı sonuçlarını desteklemektedir.

Restraint stresin, bu çalışmada incelediğimiz antioksidan parametre düzeylerinde çeşitli düzeylerde düşüşe neden olduğu tespit edildi. Bulgularımızı indirekt olarak kıyaslayabileceğimiz önceki pek çok çalışmada da kısmen benzer bulgular rapor edilmiştir.[289, 302, 329] Her ne kadar sunulan çalışmamızın bulgularında TAOK ve GSH-px seviyeleri açısından anlamlı farklar oluşmasada S grubunun TAOK ve GSH seviyelerinde, kontrol grubuna göre anlamlı olmayan düzeyde hafif bir düşüş göstermesi ($p>0.05$), S-Dp grubunun Dp grubuna göre TAOK ve GSH seviyelerinde anlamlı olmayacak düzeyde hafifçe bir düşüş göstermesi($p>0.05$) yapılan çalışmalara uygunluk göstermektedir. Ayrıca S-Mel grubunun S grubuna göre TAOK ve GSH seviyelerinde anlamlı olmayan düzeyde hafif bir artış göstermesi ($p>0.05$) ve S-DP-Mel grubunun ise S-DP grubuna göre anlamlı olmayan hafif bir artış göstermesi ($p>0.05$) de Lin ve

ark.[289]'ın melatoninin restraint stresin sebep olduğu oksidatif stresi kısıtladığı sonuçlarını desteklemektedir.

Sunulan bulgularımızda, total oksidatif durumun belirlenmesinde kullanılan OSİ değeri, S grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde etkilenmemiş olsa da hafif bir artış göstermesi ($p>0.05$) ve S-Dp grubunda, Dp grubuna göre anlamlı olacak düzeyde yükseliş göstermesiyle ($p<0.05$) Literatürde bulunan çalışmalara[289, 302, 329] kısmen uygunluk göstermektedir. Ayrıca S-Mel grubunda, S grubuna göre OSİ seviyelerinde anlamlı olmayan hafif bir düşüş meydana gelmesi ($p>0.05$) ve S-DP-Mel grubunda S-DP grubuna göre anlamlı düzeyde bir düşüş tespit edilmesi ($p<0.05$). Lin ve ark.[289]'ın melatoninin restraint stresin sebep olduğu oksidatif stresi kısıtladığı sonuçlarını desteklemektedir.

Bulgularımızda, restraint stres uygulaması, oksidatif parametrelerinin artış, antioksidan parametrelerinin azalma göstermesine sebep olmuştur. Bu değişiklikler stres ile birlikte aktive olan HPA aksının öncelikle ve uzun süre salgılanmasına sebep olduğu kortizolün, antioksidan gen ekpresyonunu azaltması ve hücresel solunumu (mitokondriyal solunum) modüle etmesinin, ROT'da artış meydana getirmesiyle mümkün olabilir.[301, 330-332] Ayrıca HPA aksının aktivasyonu ile salgılanan glukokortikoid, hücresel indirgenme-oksidasyon (redoks) sistemindeki aktiviteyi indükleyerek ROT'da artışa sebep olabilir.[330-332] Restraint stresinin NO üretimini inhibe ettiği ve bu yolla oksidatif stres oluşmasına katkıda bulunabileceği düşünülmektedir.[252] Stres ve ratlar üzerinde sebep olduğu muhtemel uyku bozukluklarıda ROT'un artışına sebep olabileceği düşünülmüştür.[10, 260] Bir organizma stres tarafından stimüle edildiğinde var olan oksidan- antioksidan sistem dengesi serbest oksijen radikallerinin salınmasıyla oksidan tarafa doğru bozulması[251, 253, 255, 289] sunulan bulgulara uyumluluk göstermektedir, melatonin uygulanan gruplarda ise stresin oksidatif ve antioksidan

parametreler üzerine oluşturduğu etkilerinin kısıtlanması, melatoninin direkt ve dolaylı antioksidan etkinliği[23-25] yanı sıra HPA aksının aktivasyonunu inhibe etmesi ile de ilişkili olabilir.[256-259]

Ligatürle indüklenen deneysel periodontitis ve restraint stres modeli ile gerçekleştirilen ve melatoninin stres ilişkili periodontal değişiklikler üzerine önleyici etkinliğini araştıran bu kapsamlı tez çalışmamız bazı limitasyonlara özellikle dikkat çekmektedir. Deneysel periodontitis modelinde destek doku yıkımı insanlardaki yıkımından farklı olarak akut karakterde ve yıkıcı bir şekilde gelişmektedir. Şiddetli lokal inflamatuar cevaba bağlı olarak belirgin sistemik inflamatuar etkiler ortaya çıkmaktadır.[333] Bu nedenle bulgularımızın insanlardaki periodontitis ile direkt olarak ilişkilendirilmesi hatalı olabilir. İkinci olarak, deneye sadece erkek ratların dahil edilmesi ve stresin dişi ratlarda etkilerini HPA aksı üzerinden daha şiddetli göstermesi[334, 335] bulguların her iki cinsiyet açısından yorumlanmasını mümkün kılmamaktadır. Literatürde psikolojik stresi hayvanlarda modellemek adına kullanılan deneysel stres protokolleri için henüz geçerli bir konsensus oluşamaması çalışmamızın bir diğer limitasyonudur. Bir diğer limitasyon olarak, ratlarda deneysel periodontitis modellemeleri açısından da bir konsensus olmaması gösterilebilir. Son olarak ne periodontitis ne de stres tedavisinde etkinliği genel olarak kabul edilmiş bir melatonin uygulama protokolü (doz, uygulama şekli, uygulama zamanı, uygulama süresi vb.) henüz mevcut değildir. Bu bağlamda, bu can alıcı konuda insan çalışmalarına öncülük edebilecek yeni ve daha kapsamlı deneysel çalışmalara ihtiyaç olduğu açıktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu deneysel çalışma;

1. Restraint stresin 35 gün süreyle uygulanmasının, kortikosteron ve açık alan testi parametrelerinde belirgin artış sağladığı ve bu artışın restraint stres protokolünün başlamasından 21 gün sonra uygulanan 14 günlük (10 mg/kg/gün) sistemik melatonin uygulamasıyla belirgin şekilde kısıtlanabildiğini,

2. Ratlarda 3.0 ipek ligatürün 35 gün süreyle uygulanmasının plak birikimi ve mekanik travmatizasyon yoluyla belirgin bir alveolar kemik kaybına neden olduğunu, restraint stresin tek başına uygulanmasının alveolar kemik kaybı üzerinde belirgin bir artış sağlamadığını, restraint stres ve periodontitisin birlikte uygulanmasının belirgin alveolar kemik kaybına neden olduğunu,

3. Periodontitis indüksiyon fazı ve restraint stres protokolünün başlamasından 21 gün sonra uygulanan 14 günlük (10 mg/kg/gün) sistemik melatonin uygulamasının stres ilişkili periodontitiste meydana gelen alveolar kemik kaybını belirgin olarak sınırlandırabildiğini,

4.Ratlarda 3.0 ipek ligatürün 35 gün süreyle uygulanmasının rat periodontal dokularında RANKL/OPG seviyesini belirgin şekilde arttırdığı, restraint stresin tek başına uygulanmasının RANKL/OPG seviyesi üzerinde belirgin bir artış sağlamadığını, restraint stres ve periodontitisin birlikte uygulanmasının RANKL/OPG seviyesini belirgin şekilde arttırdığını,

5. Periodontitis indüksiyon fazı ve restraint stres protokolünün başlamasından 21 gün sonra uygulanan 14 günlük (10 mg/kg/gün) sistemik melatonin uygulamasının stres ilişkili periodontitiste meydana RANKL/OPG seviyesi artışını belirgin olarak sınırlandırabildiğini,

6.Ratlarda 3.0 ipek ligatürün 35 gün süreyle uygulanmasının rat periodontal dokularında IL-1ß / IL-10 seviyesini belirgin şekilde arttırdığı, restraint stresin tek başına uygulanmasının IL-1ß / IL-10 seviyesi üzerinde belirgin bir artış sağlamadığını, restraint stres ve periodontitisin birlikte uygulanmasının IL-1ß / IL-10 seviyesi üzerinde belirgin bir artış sağladığını,

7. Periodontitis indüksiyon fazı ve restraint stres protokolünün başlamasından 21 gün sonra uygulanan 14 günlük (10 mg/kg/gün) sistemik melatonin uygulamasının stres ilişkili periodontitiste meydana IL-1ß / IL-10 seviyesi artışını belirgin olarak sınırlandırabildiğini,

8. Ratlarda 3.0 ipek ligatürün 35 gün süreyle uygulanmasının rat periodontal dokularında OSİ seviyesini hafif bir şekilde arttırdığı, restraint stresin tek başına uygulanmasının OSİ seviyesi üzerinde belirgin olmayan bir artış sağladığını, restraint stres ve periodontitisin birlikte uygulanmasının OSİ seviyesini belirgin şekilde arttırdığını,

9. Periodontitis indüksiyon fazı ve restraint stres protokolünün başlamasından 21 gün sonra uygulanan 14 günlük (10 mg/kg/gün) sistemik melatonin uygulamasının stres ilişkili periodontitiste meydana OSİ artışını belirgin olarak sınırlandırabildiğini,

10. Ratlarda 3.0 ipek ligatürün 35 gün süreyle uygulanmasının rat periodontal dokularında MMP-8 seviyesini hafif bir şekilde arttırdığı, restraint stresin tek başına uygulanmasının MMP-8 seviyesi üzerinde belirgin bir artış sağlayamadığını, restraint stres ve periodontitisin birlikte uygulanmasının MMP-8 seviyesini belirgin şekilde arttırdığını,

11. Periodontitis indüksiyon fazı ve restraint stres protokolünün başlamasından 21 gün sonra uygulanan 14 günlük (10 mg/kg/gün) sistemik melatonin uygulamasının

stres ilişkili periodontitiste meydana MMP-8 seviyesi artışını belirgin olarak sınırlandırabildiğini,

12. Ratlarda 3.0 ipek ligatürün 35 gün süreyle uygulanmasının rat periodontal dokularında MMP-9 seviyesini belirgin bir şekilde arttırdığı, restraint stresin tek başına uygulanmasının MMP-9 seviyesi üzerinde belirgin bir artış sağlayamadığını, restraint stres ve periodontitisin birlikte uygulanmasının MMP-9 seviyesini belirgin şekilde arttırdığını,

13. Periodontitis indüksiyon fazı ve restraint stres protokolünün başlamasından 21 gün sonra uygulanan 14 günlük (10 mg/kg/gün) sistemik melatonin uygulamasının stres ilişkili periodontitiste meydana MMP-9 seviyesi artışını hafif bir şekilde sınırlandırabildiğini ortaya koydu.

Sistemik melatonin uygulaması stresin periodontal dokulardaki sınırlı düzeydeki yıkıcı etkilerini belirgin bir şekilde önleyebilmektedir. Melatonin, bir konak modülatör ajan olarak, stres ilişkili olumsuz periodontal etkileri ortadan kaldırmada yeni bir perspektif ortaya koymaktadır. Bu kapsamlı çalışmanın melatoninin periodontal etkinliğine odaklanacak gelecekteki insan çalışmalarına öncülük edebileceği düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, Flemmig TF, Garcia R, Giannobile WV, Graziani F. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol*. 2018, 89:S173-S182.
2. Beck J, Garcia R, Heiss G, Vokonas PS, Offenbacher S. Periodontal disease and cardiovascular disease. *J Periodontol*. 1996, 67:1123-1137.
3. Preshaw P, Alba A, Herrera D, Jepsen S, Konstantinidis A, Makrilakis K, Taylor R. Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. *Diabetologia*. 2012, 55:21-31.
4. Bartold PM. Periodontal tissues in health and disease: introduction. *Periodontol 2000*. 2006, 40:7-10.
5. Genco RJ. Current view of risk factors for periodontal diseases. *J Periodontol*. 1996, 67:1041-1049.
6. LeResche L, Dworkin SF. The role of stress in inflammatory disease, including periodontal disease: review of concepts and current findings. *Periodontol 2000*. 2002, 30:91-103.
7. Cohen S, Janicki-Deverts D, Doyle WJ, Miller GE, Frank E, Rabin BS, Turner RB. Chronic stress, glucocorticoid receptor resistance, inflammation, and disease risk. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012, 109:5995-5999.
8. Netea MG, Balkwill F, Chonchol M, Cominelli F, Donath MY, Giamarellos-Bourboulis EJ, Golenbock D, Gresnigt MS, Heneka MT, Hoffman HM, Hotchkiss R, Joosten LAB, Kastner DL, Korte M, Latz E, Libby P, Mandrup-Poulsen T, Mantovani A, Mills KHG, Nowak KL, O'Neill LA, Pickkers P, van der Poll T, Ridker PM, Schalkwijk J, Schwartz DA, Siegmund B, Steer CJ, Tilg H, van der Meer JWM, van de Veerdonk FL, Dinarello CA. Author Correction: A guiding map for inflammation. *Nat Immunol*. 2021, 22:254.
9. Moss ME, Beck JD, Kaplan BH, Offenbacher S, Weintraub JA, Koch GG, Genco RJ, Machtei EE, Tedesco LA. Exploratory case-control analysis of psychosocial factors and adult periodontitis. *J Periodontol*. 1996, 67:1060-1069.
10. Spector AM, Postolache TT, Akram F, Scott AJ, Wadhawan A, Reynolds MA. Psychological Stress: A Predisposing and Exacerbating Factor in Periodontitis. *Current Oral Health Reports*. 2020, 7:208-215.
11. Castro GD, Oppermann RV, Haas AN, Winter R, Alchieri JC. Association between psychosocial factors and periodontitis: a case-control study. *J Clin Periodontol*. 2006, 33:109-114.
12. Genco RJ, Ho AW, Grossi SG, Dunford RG, Tedesco LA. Relationship of stress, distress and inadequate coping behaviors to periodontal disease. *J Periodontol*. 1999, 70:711-723.
13. Hugoson A, Ljungquist B, Breivik T. The relationship of some negative events and psychological factors to periodontal disease in an adult Swedish population 50 to 80 years of age. *J Clin Periodontol*. 2002, 29:247-253.
14. Peruzzo DC, Benatti BB, Antunes IB, Andersen ML, Sallum EA, Casati MZ, Nociti Jr FH, Nogueira-Filho GR. Chronic stress may modulate periodontal disease: a study in rats. *J Periodontol*. 2008, 79:697-704.
15. Takada T, Yoshinari N, Sugiishi S, Kawase H, Yamane T, Noguchi T. Effect of restraint stress on the progression of experimental periodontitis in rats. *J Periodontol*. 2004, 75:306-315.

16. Nakajima K, Hamada N, Takahashi Y, Sasaguri K, Tsukinoki K, Umemoto T, Sato S. Restraint stress enhances alveolar bone loss in an experimental rat model. *J Periodontal Res*. 2006, 41:527-534.
17. Petit C, Anadon-Rosinach V, Rettig L, Schmidt-Mutter C, Tuzin N, Davideau JL, Huck O. Influence of psychological stress on non-surgical periodontal treatment outcomes in patients with severe chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2021, 92:186-195.
18. Sudhanshu A, Sharma U, Vadiraja HS, Rana RK, Singhal R. Impact of Yoga on Periodontal Disease and Stress Management. *Int J Yoga*. 2017, 10:121-127.
19. Blalock JE. The syntax of immune-neuroendocrine communication. *Immunol Today*. 1994, 15:504-511.
20. Mantyh PW. Substance P and the inflammatory and immune response. *Ann N Y Acad Sci*. 1991, 632:263-271.
21. Segerstrom SC, Miller GE. Psychological stress and the human immune system: a meta-analytic study of 30 years of inquiry. *Psychol Bull*. 2004, 130:601-630.
22. Ozcelik F, Erdem M, Bolu A, Gulsun M. Melatonin: General Features and its Role in Psychiatric Disorders/Melatonin: Genel Ozellikleri ve Psikiyatrik Bozukluklardaki Rolu. *Psikiyatride Guncel Yaklasimlar/Current Approaches to Psychiatry*. 2013, 5:179-204.
23. Galano A, Tan DX, Reiter RJ. On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK. *Journal of pineal research*. 2013, 54:245-257.
24. Atasoy ÖB, Erbaş OJİBÜFNTD. Melatonin hormonunun fizyolojik etkileri. *İstanbul Bilim Üniversitesi Florence Nightingale Tıp Dergisi* 2017, 3:52-62.
25. Mauriz JL, Collado PS, Veneroso C, Reiter RJ, González-Gallego J. A review of the molecular aspects of melatonin’s anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. *Journal of pineal research*. 2013, 54:1-14.
26. Paulis L, Šimko F. Blood pressure modulation and cardiovascular protection by melatonin: potential mechanisms behind. *Physiological research*. 2007, 56.
27. Karamitri A, Jockers R. Melatonin in type 2 diabetes mellitus and obesity. *Nature Reviews Endocrinology*. 2019, 15:105-125.
28. Meenakshi SS, Malaiappan S. Role of melatonin in periodontal disease-A systematic review. *Indian Journal of Dental Research* 2020, 31:593.
29. Kinane D, Stathopoulou P, Papapanou P. Periodontal Diseases. Nature Reviews Disease Primers, 3, Article No. 17038. 2017.
30. Zambon JJ. Periodontal diseases: microbial factors. *Annals of Periodontology*. 1996, 1:879-925.
31. Berezow AB, Darveau RP. Microbial shift and periodontitis. *Periodontology*. 2011, 55:36.
32. Kirkwood KL, Cirelli JA, Rogers JE, Giannobile WV. Novel host response therapeutic approaches to treat periodontal diseases. *Periodontology*. 2007, 43:294.
33. Huang S, Li Z, He T, Bo C, Chang J, Li L, He Y, Liu J, Charbonneau D, Li R. Microbiota-based signature of gingivitis treatments: a randomized study. *Sci Rep*. 2016, 6:1-9.
34. Sheiham A. Is the chemical prevention of gingivitis necessary to prevent severe periodontitis? *Periodontology*. 1997, 15:15.
35. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol*. 2018, 89:S159-S172.

36. ALPAN AL, TOKER H. Cerrahi Olmayan Periodontal Tedaviyle Birlikte Sistemik İlaç Uygulamaları. *Türkiye Klinikleri Periodontoloji-Özel Konular*. 2019, 5:21-28.
37. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple IL, Jepsen S, Kornman KS, Mealey BL, Papapanou PN, Sanz M, Tonetti MS. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions–Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Periodontol*. 2018, 89:S1-S8.
38. Lang NP, Bartold PM. Periodontal health. *J Periodontol*. 2018, 89:S9-S16.
39. Trombelli L, Farina R, Silva CO, Tatakis DN. Plaque-induced gingivitis: Case definition and diagnostic considerations. *J Clin Periodontol*. 2018, 45:S44-S67.
40. Chapple IL, Mealey BL, Van Dyke TE, Bartold PM, Dommisch H, Eickholz P, Geisinger ML, Genco RJ, Glogauer M, Goldstein M. Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of periodontology*. 2018, 89:S74-S84.
41. Mariotti A. Dental plaque-induced gingival diseases. *Annals of Periodontology*. 1999, 4:7-17.
42. Sheiham A. Impact of dental treatment on the incidence of dental caries in children and adults. *Community dentistry oral epidemiology*. 1997, 25:104-112.
43. Stone SJ, Heasman PA, Staines KS, McCracken GI. The impact of structured plaque control for patients with gingival manifestations of oral lichen planus: a randomized controlled study. *J Clin Periodontol*. 2015, 42:356-362.
44. Holmstrup P, Plemons J, Meyle J. Non–plaque-induced gingival diseases. *Journal of clinical periodontology*. 2018, 45:S28-S43.
45. Lindhe J, Ranney R, Lamster I, Charles A, Chung CP, Flemmig T, Kinane D, Listgarten M, Löe H, Schoor R. Consensus report: chronic periodontitis. *Annals of Periodontology*. 1999, 4:38-38.
46. Chapple IL, Van der Weijden F, Doerfer C, Herrera D, Shapira L, Polak D, Madianos P, Louropoulou A, Machtei E, Donos N. Primary prevention of periodontitis: managing gingivitis. *J Clin Periodontol*. 2015, 42:S71-S76.
47. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple IL, Jepsen S, Kornman KS, Mealey BL, Papapanou PN, Sanz M, Tonetti MS. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions–Introduction and key changes from the 1999 classification. *Journal of periodontology*. 2018, 89:S1-S8.
48. Periodontitis O. American Academy of Periodontology Task Force report on the update to the 1999 classification of periodontal diseases and conditions. *J Periodontol*. 2015, 86:835-838.
49. Needleman I, Garcia R, Gkranias N, Kirkwood KL, Kocher T, Iorio AD, Moreno F, Petrie A. Mean annual attachment, bone level, and tooth loss: A systematic review. *J Clin Periodontol*. 2018, 45:S112-S129.
50. Shaddox LM, Walker CB. Treating chronic periodontitis: current status, challenges, and future directions. *Clinical, cosmetic investigational dentistry*. 2010, 2:79.
51. Cullinan MP, Westerman B, Hamlet SM, Palmer JE, Faddy MJ, Lang NP, Seymour GJ. A longitudinal study of interleukin-1 gene polymorphisms and periodontal disease in a general adult population. *Journal of clinical periodontology*. 2001, 28:1137-1144.
52. Feng Z, Weinberg A. Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. *Periodontology*. 2006, 40:50-76.

53. Kornman KS. Mapping the pathogenesis of periodontitis: a new look. *J Periodontol*. 2008, 79:1560-1568.
54. Offenbacher S. Periodontal diseases: pathogenesis. *Annals of Periodontology*. 1996, 1:821-878.
55. Kamma J, Mombelli A, Tsinidou K, Vasdekis V, Giannopoulou C. Cytokines in gingival crevicular fluid of adolescents and young adults. *Oral microbiology immunology today*. 2009, 24:7-10.

56. Kornman KS, Page RC, Tonetti MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontology*. 1997, 14:33-53.
57. Kinane DF. Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontology*. 2001, 25:8-20.
58. Ishikawa I, Aoki A, Takasaki AA, Mizutani K, Sasaki KM, Izumi Y. Application of lasers in periodontics: true innovation or myth? *Periodontology*. 2009, 50:90-126.
59. Van Dyke TE, Kornman KS. Inflammation and factors that may regulate inflammatory response. *J Periodontol*. 2008, 79:1503-1507.
60. Kinane DF, Podmore M, Ebersole J. Etiopathogenesis of periodontitis in children and adolescents. *Periodontology*. 2001, 26:54-91.
61. Medzhitov R, Janeway Jr C. Innate immunity. *New England Journal of Medicine*. 2000, 343:338-344.
62. Walsh LJ. Mast cells and oral inflammation. *Critical reviews in oral biology medicine*. 2003, 14:188-198.

63. Zadeh HH, Nichols FC, Miyasaki KT. The role of the cell-mediated immune response to Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis in periodontitis. *Periodontology*. 1999, 20:239-288.
64. Rietschel ET, Brade H. Bacterial endotoxins. *Scientific american*. 1992, 267:54-61.
65. Cekici A, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontology*. 2014, 64:57-80.
66. Gelani V, Fernandes AP, Gasparoto TH, Garlet TP, Cestari TM, Lima HR, Ramos Jr ES, de Souza Malaspina TS, Santos CF, Garlet GP. The role of toll-like receptor 2 in the recognition of Aggregatibacter actinomycetemcomitans. *J Periodontol*. 2009, 80:2010-2019.
67. Haffajee A, Dibart S, Kent Jr R, Socransky S. Factors associated with different responses to periodontal therapy. *Journal of Clinical Periodontology* 1995, 22:628-636.

68. Lindhe J, Liljenberg B, Listgarten M. Some microbiological and histopathological features of periodontal disease in man. *J Periodontol*. 1980, 51:264-269.
69. Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontology*. 1997, 14:216-248.
70. Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontology*. 1997, 14:216-248.
71. Mosmann T, Coffman R. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual review of immunology*. 1989, 7:145-173.
72. Ara T, Kurata K, Hirai K, Uchihashi T, Uematsu T, Imamura Y, Furusawa K, Kurihara S, Wang PL. Human gingival fibroblasts are critical in sustaining inflammation in periodontal disease. *J Periodontal Res*. 2009, 44:21-27.

73. Cekici A, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontology*. 2014, 64:57-80.
74. Billack B. Macrophage activation: role of toll-like receptors, nitric oxide, and nuclear factor kappa B. *American journal of pharmaceutical education*. 2006, 70.
75. Hirschfeld L, Wasserman B. A long-term survey of tooth loss in 600 treated periodontal patients. *Journal of periodontology*. 1978, 49:225-237.
76. Reynolds JJ, Meikle MC. Mechanisms of connective tissue matrix destruction in periodontitis. *Periodontology*. 1997, 14:144-157.
77. Garlet G. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *J Dent Res*. 2010, 89:1349-1363.
78. Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *Journal of periodontology*. 1993, 64:474-484.
79. Kinane D, Darby I, Said S, Luoto H, Sorsa T, Tikanoja S, Mäntylä P. Changes in gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8 levels during periodontal treatment and maintenance. *J Periodontal Res*. 2003, 38:400-404.
80. Smalley J. Pathogenic mechanisms in periodontal disease. *Advances in dental research*. 1994, 8:320-328.
81. Chapple IL, Matthews JB. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontology 2000*. 2007, 43:160-232.
82. Dennison DK, VAN DYKE TE. The acute inflammatory response and the role of phagocytic cells in periodontal health and disease. *Periodontology*. 1997, 14:54-78.
83. Özçaka Ö, Bıçakcı N, Pussinen P, Sorsa T, Köse T, Buduneli N. Smoking and matrix metalloproteinases, neutrophil elastase and myeloperoxidase in chronic periodontitis. *Oral diseases*. 2011, 17:68-76.
84. Cochran DL. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J Periodontol*. 2008, 79:1569-1576.
85. Baltacıoğlu E, Kehribar MA, Yuva P, Alver A, Atagün ÖS, Karabulut E, Akalın FA. Total oxidant status and bone resorption biomarkers in serum and gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *Journal of periodontology*. 2014, 85:317-326.
86. Kierszenbaum AL, Demir R. *Histoloji Ve Hücrebiyolojisi: Patolojiye Giriş*, ed., Palme Yayıncılık, 2006.
87. Belibasakis GN, Bostanci N. The RANKL-OPG system in clinical periodontology. *J Clin Periodontol*. 2012, 39:239-248.
88. Taubman MA, Valverde P, Han X, Kawai T. Immune response: the key to bone resorption in periodontal disease. *J Periodontol*. 2005, 76:2033-2041.
89. Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, Kawakami A, Eguchi K, Sasaki H, Sakai H. Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-κB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochemical biophysical research communications*. 2000, 275:768-775.
90. Mogi M, Otogoto J, Ota N, Togari A. Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *J Dent Res*. 2004, 83:166-169.
91. Crotti T, Smith MD, Hirsch R, Soukoulis S, Weedon H, Capone M, Ahern MJ, Haynes D. Receptor activator NF kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. *J Periodontal Res*. 2003, 38:380-387.
92. Napimoga MH, Benatti BB, Lima FO, Alves PM, Campos AC, Pena-Dos-Santos DR, Severino FP, Cunha FQ, Guimarães FS. Cannabidiol decreases bone resorption by inhibiting RANK/RANKL expression and pro-inflammatory cytokines during experimental periodontitis in rats. *Int Immunopharmacol*. 2009, 9:216-222.

93. Wara-aswapati N, Surarit R, Chayasadom A, Boch JA, Pitiphat W. RANKL upregulation associated with periodontitis and Porphyromonas gingivalis. *J Periodontol*. 2007, 78:1062-1069.
94. Balkwill F, Burke F. The cytokine network. *Immunology today*. 1989, 10:299-304.
95. Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Critical Reviews in Oral Biology Medicine*. 1998, 9:248-266.

96. Owen JA, Punt J, Stranford SA. *Kuby immunology*, ed., WH Freeman New York, 2013.
97. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. 1996.
98. Yi-June L, Cheing-Meei L, Man-Ying W, Lein-Tuan H, Wei-Kuei Ce. Interleukin 1β-secreting cells in inflamed gingival tissue of adult periodontitis patients. *Cytokin*. 1999, 11:626-633.
99. Marshall D, Haskard DO, editors. Clinical overview of leukocyte adhesion and migration: where are we now? seminars in IMMUNOLOGY; 2002: Elsevier.
100. Gravallese EM, Galson DL, Goldring SR, Auron PE. The role of TNF-receptor family members and other TRAF-dependent receptors in bone resorption. *Arthritis Research Therapy*. 2000, 3:6.

101. Tatakis D. Interleukin-1 and bone metabolism: a review. *J Periodontol*. 1993, 64:416.
102. Koide M, Suda S, Saitoh S, Ofuji Y, Suzuki T, Yoshie H, Takai M, Ono Y, Taniguchi Y, Hara K. In vivo administration of IL-1β accelerates silk ligature-induced alveolar bone resorption in rats. *Journal of oral pathology medicine*. 1995, 24:420-434.

103. Heasman P, Collins J, Offenbacher S. Changes in crevicular fluid levels of interleukin-1β, leukotriene B4, prostaglandin E2, thromboxane B2 and tumour necrosis factor α in experimental gingivitis in humans. *Journal of periodontal research*. 1993, 28:241-247.
104. Smith M, Braswell L, Collins J, Boyd D, Jeffcoat M, Reddy M, Li K, Wilensky S, Vogel R, Alfano M. Changes in inflammatory mediators in experimental periodontitis in the rhesus monkey. *Infection immunity*. 1993, 61:1453-1459.

105. Offenbacher S, Barros S, Mendoza L, Mauriello S, Preisser J, Moss K, De Jager M, Aspiras M. Changes in gingival crevicular fluid inflammatory mediator levels during the induction and resolution of experimental gingivitis in humans. *J Clin Periodontol*. 2010, 37:324-333.
106. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology*. 2004, 25:677-686.
107. Mills KH. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nature Reviews Immunology*. 2004, 4:841-855.
108. O'Garra A, Vieira PL, Vieira P, Goldfeld AE. IL-10–producing and naturally occurring CD4+ Tregs: limiting collateral damage. *The Journal of clinical investigation*. 2004, 114:1372-1378.
109. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and molecular immunology E-book*, ed., Elsevier Health Sciences, 2014.
110. Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2004, 22:531-562.

111. Cassatella MA, Meda L, Bonora S, Ceska M, Constantin G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 beta in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide. *The Journal of experimental medicine*. 1993, 178:2207-2211.
112. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual review of immunology*. 2001, 19:683-765.
113. Asadullah K, Sterry W, Volk H. Interleukin-10 therapy—review of a new approach. *Pharmacological reviews*. 2003, 55:241-269.
114. Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontology*. 1997, 14:112-143.
115. Bidwell J, Keen L, Gallagher G, Kimberly R, Huizinga T, McDermott M, Oksenberg J, McNicholl J, Pociot F, Hardt C. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. *Genes immunity*1999, 1:3-19.

116. Eskdale J, Keijsers V, Huizinga T, Gallagher G. Microsatellite alleles and single nucleotide polymorphisms (SNP) combine to form four major haplotype families at the human interleukin-10 (IL-10) locus. *Genes Immunity*. 1999, 1:151-155.

117. O'Garra A, Barrat FJ, Castro AG, Vicari A, Hawrylowicz C. Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease. *Immunological reviews*. 2008, 223:114-131.
118. Lacraz S, Nicod LP, Chicheportiche R, Welgus HG, Dayer J-M. IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes. *The Journal of clinical investigation* 1995, 96:2304-2310.

119. Sasaki H, Okamatsu Y, Kawai T, Kent R, Taubman M, Stashenko P. The interleukin-10 knockout mouse is highly susceptible to Porphyromonas gingivalis-induced alveolar bone loss. *J Periodontal Res*. 2004, 39:432-441.
120. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation research*. 2003, 92:827-839.
121. Nagase H, Woessner JF. Matrix metalloproteinases. *Journal of Biological Chemistry*. 1999, 274:21491-21494.
122. Ryan M, Ramamurthy S, Golub L. Matrix metalloproteinases and their inhibition in periodontal treatment. *Current opinion in periodontology*. 1996, 3:85-96.
123. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annual review of cell developmental biology*. 2001, 17:463-516.

124. Mazzoni A, Breschi L, Carrilho M, Nascimento FD, Orsini G, Ruggeri Jr A, Gobbi P, Manzoli L, Tay FR, Pashley DH. A review of the nature, role, and function of dentin non-collagenous proteins. Part II: enzymes, serum proteins, and growth factors. *Endodontic Topics*. 2009, 21:19-40.
125. Letra A, Silva RM, Rylands RJ, Silveira EM, de Souza AP, Wendell SK, Garlet GP, Vieira AR. MMP3 and TIMP1 variants contribute to chronic periodontitis and may be implicated in disease progression. *J Clin Periodontol*. 2012, 39:707-716.
126. Tervahartiala T, Pirilä E, Ceponis A, Maisi P, Salo T, Tuter G, Kallio P, Törnwall J, Srinivas R, Konttinen Y. The in vivo expression of the collagenolytic matrix metalloproteinases (MMP-2,-8,-13, and-14) and matrilysin (MMP-7) in adult and localized juvenile periodontitis. *J Dent Res*. 2000, 79:1969-1977.
127. MacNaul K, Chartrain N, Lark M, Tocci M, Hutchinson N. Discoordinate expression of stromelysin, collagenase, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in

rheumatoid human synovial fibroblasts. Synergistic effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha on stromelysin expression. *Journal of Biological Chemistry*. 1990, 265:17238-17245.
128. Inui T, Ishibashi O, Origane Y, Fujimori K, Kokubo T, Nakajima M. Matrix metalloproteinases and lysosomal cysteine proteases in osteoclasts contribute to bone resorption through distinct modes of action. *Biochemical biophysical research communications*. 1999, 258:173-178.

129. Delaissé JM, Andersen TL, Engsig MT, Henriksen K, Troen T, Blavier L. Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities. *Microscopy research technique*. 2003, 61:504-513.

130. Golub LM, Siegel K, Ramamurthy N, Mandel ID. Some characteristics of collagenase activity in gingival crevicular fluid and its relationship to gingival diseases in humans. *Journal of Dental Research*. 1976, 55:1049-1057.
131. Mäntylä P, Stenman M, Kinane D, Salo T, Suomalainen K, Tikanoja S, Sorsa T. Monitoring periodontal disease status in smokers and nonsmokers using a gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8-specific chair-side test. *J Periodontal Res*. 2006, 41:503-512.
132. Ingman T, Sorsa T, Suomalainen K, Halinen S, Lindy O, Lauhio A, Saari H, Konttinen YT, Golub LM. Tetracycline inhibition and the cellular source of collagenase in gingival crevicular fluid in different periodontal diseases. A review article. *Journal of periodontology*. 1993, 64:82-88.
133. Uitto VJ, Overall CM, McCulloch C. Proteolytic host cell enzymes in gingival crevice fluid. *Periodontology*. 2003, 31:77-104.
134. Golub L, Lee H, Greenwald R, Ryan M, Sorsa T, Salo T, Giannobile W. A matrix metalloproteinase inhibitor reduces bone-type collagen degradation fragments and specific collagenases in gingival crevicular fluid during adult periodontitis. *Inflammation Research*. 1997, 46:310-319.
135. Ingman T, Tervahartiala T, Ding Y, Tschesche H, Haerian A, Kinane DF, Konttinen YT, Sorsa T. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients. *J Clin Periodontol*. 1996, 23:1127-1132.
136. Gursoy UK, Könönen E, Pradhan-Palikhe P, Tervahartiala T, Pussinen PJ, Suominen-Taipale L, Sorsa T. Salivary MMP-8, TIMP-1, and ICTP as markers of advanced periodontitis. *Journal of clinical periodontology* 2010, 37:487-493.

137. Opdenakker G, Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Van Coillie E, Masure S, Proost P, Van Damme J. Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *Journal of leukocyte biology*. 2001, 69:851-859.
138. Woessner Jr JF. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *The FASEB journal*. 1991, 5:2145-2154.
139. Murphy G, Bretz U, Baggiolini M, Reynolds J. The latent collagenase and gelatinase of human polymorphonuclear neutrophil leucocytes. *Biochemical Journal*. 1980, 192:517-525.
140. Hipps DS, HEMBRY RM, DocHERTY AJ, REYNOLDS JJ, MURPHY G. Purification and characterisation of human 72-kDa gelatinase (type IV collagenase). Use of immunolocalisation to demonstrate the non-coordinate regulation of the 72-kDa and 95-kDa gelatinases by human fibroblasts. *Biological Chemistry*. 1991, 372:287-296.
141. Westermarck J, Kähäri VM. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *The FASEB journal*. 1999, 13:781-792.

142. Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2002, 37:375-536.
143. Mohan MJ, Seaton T, Mitchell J, Howe A, Blackburn K, Burkhart W, Moyer M, Patel I, Waitt GM, Becherer JD. The Tumor Necrosis Factor-α Converting Enzyme (TACE): A Unique Metalloproteinase with Highly Defined Substrate Selectivity. *Biochemistry*. 2003, 42:11092-11092.
144. Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-β and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes development*. 2000, 14:163-176.

145. Ejeil AL, Igondjo-Tchen S, Ghomrasseni S, Pellat B, Godeau G, Gogly B. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in healthy and diseased human gingiva. *J Periodontol*. 2003, 74:188-195.
146. Mäntylä P, Stenman M, Kinane DF, Tikanoja S, Luoto H, Salo T, Sorsa T. Gingival crevicular fluid collagenase-2 (MMP-8) test stick for chair-side monitoring of periodontitis. *J Periodontal Res*. 2003, 38:436-439.
147. Canakci C, Cicek Y, Canakci V. Reactive oxygen species and human inflammatory periodontal diseases. *Biochemistry*. 2005, 70:619-628.
148. Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol*. 1990, 186:1-85.
149. Niki E. Interaction of ascorbate and alpha-tocopherol. *Ann N Y Acad Sci*. 1987, 498:186-199.
150. Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1994, 91:10771-10778.
151. Cullinan MP, Seymour GJJP. Periodontal disease and systemic illness: will the evidence ever be enough? *Periodontology* 2013, 62:271-286.

152. Bullon P, Newman HN, Battino M. Obesity, diabetes mellitus, atherosclerosis and chronic periodontitis: a shared pathology via oxidative stress and mitochondrial dysfunction? *Periodontology*. 2014, 64:139-153.
153. Southerland JH, Taylor GW, Moss K, Beck JD, Offenbacher S. Commonality in chronic inflammatory diseases: periodontitis, diabetes, and coronary artery disease. *Periodontology*. 2006, 40:130-143.
154. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. *Mimoza Yayınları, Konya*. 1995, 1:57-63.
155. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry cell biology*. 2007, 39:44-84.

156. Khalili J, Biloklytska H. Salivary malondialdehyde levels in clinically healthy and periodontal diseased individuals. *Oral diseases*. 2008, 14:754-760.
157. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, metabolism cardiovascular diseases*. 2005, 15:316-328.

158. Akalın FA, Baltacıoğlu E, Alver A, Karabulut E. Lipid peroxidation levels and total oxidant status in serum, saliva and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2007, 34:558-565.
159. Meister A. [1] Glutathione metabolism. *Methods in enzymology*. 1995, 251:3-7.

160. Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine Pharmacotherapy*. 2003, 57:145-155.

161. M. Green R, Graham M, RO'Donovan M, Chipman JK, J. Hodges N. Subcellular compartmentalization of glutathione: correlations with parameters of oxidative stress related to genotoxicity. *Mutagenesis*. 2006, 21:383-390.
162. Chai Y-C, Ashraf SS, Rokutan K, Johnston RB, Thomas JA. S-thiolation of individual human neutrophil proteins including actin by stimulation of the respiratory burst: evidence against a role for glutathione disulfide. *Archives of biochemistry biophysics*. 1994, 310:273-281.

163. REED DJ. Glutathione depletion and susceptibility. *Pharmacol Rev*. 1984, 36:25S-33S.
164. Sen S, Chakraborty R. The role of antioxidants in human health. *Oxidative stress: diagnostics, prevention, and therapy*ed, ACS Publications,2011: 1-37.
165. Baltacıoğlu E, Yuva P, Aydın G, Alver A, Kahraman C, Karabulut E, Akalın FA. Lipid peroxidation levels and total oxidant/antioxidant status in serum and saliva from patients with chronic and aggressive periodontitis. Oxidative stress index: a new biomarker for periodontal disease? *J Periodontol*. 2014, 85:1432-1441.
166. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical biochemistry*. 2005, 38:1103-1111.
167. Işik A, Selek S. Total antioxidant response and oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis. *FıratÜniversitesiSağlıkBilimleri Tıp Dergisi*. 2007, 21:067-073.
168. Chapple I, Brock G, Milward M, Ling N, Matthews J. Compromised GCF total antioxidant capacity in periodontitis: cause or effect? *Journal of clinical periodontology*. 2007, 34:103-110.
169. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clinical biochemistry*. 2004, 37:112-119.
170. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation , more stable ABTS radicalcation.*Clinicalbiochemistry*. 2004, 37:277-285

171. Kusano C, Ferrari B. Total antioxidant capacity: a biomarker in biomedical and nutritional studies. *Journal of cell molecular biology*. 2008, 7:1-15.

172. Baltacıoğlu E, Yuva P, Aydın G, Alver A, Kahraman C, Karabulut E, Akalın FA. Lipid peroxidation levels and total oxidant/antioxidant status in serum and saliva from patients with chronic and aggressive periodontitis. Oxidative stress index: a new biomarker for periodontal disease? *J Periodontol*. 2014, 85:1432-1441.
173. Kose O, Arabaci T, Kara A, Yemenoglu H, Kermen E, Kizildag A, Gedikli S, Ozkanlar S. Effects of melatonin on oxidative stress index and alveolar bone loss in diabetic rats with periodontitis. *J Periodontol*. 2016, 87:e82-e90.
174. Chen M, Cai W, Zhao S, Shi L, Chen Y, Li X, Sun X, Mao Y, He B, Hou Y. Oxidative stress-related biomarkers in saliva and gingival crevicular fluid associated with chronic periodontitis: A systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol*. 2019, 46:608-622.
175. Baltacıoğlu E, Yuva P, Aydın G, Alver A, Kahraman C, Karabulut E, Akalın FA. Lipid peroxidation levels and total oxidant/antioxidant status in serum and saliva from patients with chronic and aggressive periodontitis. Oxidative stress index: a new biomarker for periodontal disease? *Journal of periodontology*. 2014, 85:1432-1441.

176. Esen Ç, Alkan BA, Kırnap M, Akgül Ö, Işıkoğlu S, Erel Ö. The effects of chronic periodontitis and rheumatoid arthritis on serum and gingival crevicular fluid total antioxidant/oxidant status and oxidative stress index. *J Periodontol*. 2012, 83:773-779.
177. Chapple IL, Matthews JB. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontology 2000*. 2007, 43:160-232.
178. Abou Sulaiman AE, Shehadeh RM. Assessment of total antioxidant capacity and the use of vitamin C in the treatment of non-smokers with chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2010, 81:1547-1554.
179. Kim S-C, Kim O-S, Kim O-J, Kim Y-J, Chung H-J. Antioxidant profile of whole saliva after scaling and root planing in periodontal disease. *Journal of periodontal implant science*. 2010, 40:164-171.

180. Waddington RJ, Moseley R, Embery G. Periodontal Disease Mechanisms: Reactive oxygen species: a potential role in the pathogenesis of periodontal diseases. *Oral diseases*. 2000, 6:138-151.
181. Battino M, Bullon P, Wilson M, Newman H. Oxidative injury and inflammatory periodontal diseases: the challenge of anti-oxidants to free radicals and reactive oxygen species. *Critical Reviews in Oral Biology Medicine*. 1999, 10:458-476.

182. Mettraux G, Gusberti F, Graf H. Oxygen tension (pO2) in untreated human periodontal pockets. *J Periodontol*. 1984, 55:516-521.
183. Sculley DV, Langley-Evans SC. Salivary antioxidants and periodontal disease status. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2002, 61:137-143.
184. Esen C, Alkan BA, Kırnap M, Akgül O, Işıkoğlu S, Erel O. The effects of chronic periodontitis and rheumatoid arthritis on serum and gingival crevicular fluid total antioxidant/oxidant status and oxidative stress index. *J Periodontol*. 2012, 83:773-779.
185. Tonguç MÖ, Öztürk Ö, Sütçü R, Ceyhan BM, Kılınç G, Sönmez Y, Yetkin Ay Z, Şahin Ü, Baltacıoğlu E, Kırzıoğlu FY. The impact of smoking status on antioxidant enzyme activity and malondialdehyde levels in chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2011, 82:1320-1328.
186. Selye H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*. 1936, 138:32-32.
187. Chrousos GP. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med*. 1995, 332:1351-1362.
188. Dimsdale JE. Psychological stress and cardiovascular disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 2008, 51:1237-1246.
189. Johnson EO, Kamilaris TC, Chrousos GP, Gold PW. Mechanisms of stress: a dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*. 1992, 16:115-130.

190. Selye H. The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *The Journal of Clinical Endocrinology*. 1946, 6:117-230.
191. Wagner H, Nörr H, Winterhoff H. Plant adaptogens. *Phytomedicine*. 1994, 1:63-76.
192. Selye H. *Stress in health and disease*, ed., Butterworth-Heinemann, 2013.
193. Tsuchida S, Satoh M, Takiwaki M, Nomura F. Ubiquitination in periodontal disease: A review. *Int J Mol Sci*. 2017, 18:1476.
194. Stødle IH, Verket A, Høvik H, Sen A, Koldsland OC. Prevalence of periodontitis based on the 2017 classification in a Norwegian population: The HUNT study. *J Clin Periodontol*. 2021, 48:1189-1199.

195. Genco RJ. Current view of risk factors for periodontal diseases. *Journal of periodontology*. 1996, 67:1041-1049.
196. Monteiro da Silva A, Oakley D, Newman H, Nohl F, Lloyd H. Psychosocial factors and adult onset rapidly progressive periodontitis. *J Clin Periodontol*. 1996, 23:789-794.
197. Irwin M, Patterson T, Smith TL, Caldwell C, Brown SA, Gillin JC, Grant I. Reduction of immune function in life stress and depression. *Biol Psychiatry*. 1990, 27:22-30.
198. Biondi M, Zannino L-G. Psychological stress, neuroimmunomodulation, and susceptibility to infectious diseases in animals and man: a review. *Psychotherapy psychosomatics*. 1997, 66:3-26.

199. Marcenes WS, Sheiham A. The relationship between work stress and oral health status. *Social Science Medicine*. 1992, 35:1511-1520.

200. Freeman R, Goss S. Stress measures as predictors of periodontal disease--a preliminary communication. *Community dentistry oral epidemiology*. 1993, 21:176-177.

201. Seiffert K, Hosoi J, Torii H, Ozawa H, Ding W, Campton K, Wagner JA, Granstein RD. Catecholamines inhibit the antigen-presenting capability of epidermal Langerhans cells. *The Journal of Immunology*. 2002, 168:6128-6135.
202. Anisman H, Baines MG, Berczi I, Bernstein CN, Blennerhassett MG, Gorczynski RM, Greenberg AH, Kisil FT, Mathison RD, Nagy E, Nance DM, Perdue MH, Pomerantz DK, Sabbadini ER, Stanisz A, Warrington RJ. Neuroimmune mechanisms in health and disease: 2. Disease. *Cmaj*. 1996, 155:1075-1082.
203. Bartold P, Kylstra A, Lawson RJJoP. Substance P: an immunohistochemical and biochemical study in human gingival tissues. A role for neurogenic inflammation? *Journal of Periodontology* 1994, 65:1113-1121.

204. Williams T, Yarwood H. Effect of glucocorticosteroids on microvascular permeability. *The American review of respiratory disease*. 1990, 141:S39-S43.
205. Schleimer RP, Freeland H, Peters S, Brown K, Derse C. An assessment of the effects of glucocorticoids on degranulation, chemotaxis, binding to vascular endothelium and formation of leukotriene B4 by purified human neutrophils. *Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics*. 1989, 250:598-605.

206. Snyder DS, Unanue ER. Corticosteroids inhibit murine macrophage Ia expression and interleukin 1 production. *The Journal of Immunology*. 1982, 129:1803-1805.
207. Genco RJ, Ho AW, Kopman J, Grossi SG, Dunford RG, Tedesco LAJAoP. Models to evaluate the role of stress in periodontal disease. *Annals of Periodontology* 1998, 3:288-302.

208. Paik I-h, Toh K-y, Lee C, Kim J-j, Lee S-j. Psychological stress may induce increased humoral and decreased cellular immunity. *Behavioral Medicine*. 2000, 26:139-141.
209. Maes M, Lin A-h, Delmeire L, Van Gastel A, Kenis G, De Jongh R, Bosmans E. Elevated serum interleukin-6 (IL-6) and IL-6 receptor concentrations in posttraumatic stress disorder following accidental man-made traumatic events. *Biol Psychiatry*. 1999, 45:833-839.
210. Goebel MU, Mills PJ, Irwin MR, Ziegler MG. Interleukin-6 and tumor necrosis factor-α production after acute psychological stress, exercise, and infused isoproterenol: differential effects and pathways. *Psychosomatic Medicine*. 2000, 62:591-598.

211. Genco RJ, Ho AW, Kopman J, Grossi SG, Dunford RG, Tedesco LA. Models to evaluate the role of stress in periodontal disease. *Annals of Periodontology*. 1998, 3:288-302.
212. Deinzer R, Förster P, Fuck L, Herforth A, Stiller-Winkler R, Idel H. Increase of crevicular interleukin 1b under academic stress at experimental gingivitis sites and at sites of perfect oral hygiene. *Journal of Clinical Periodontology*. 1999, 26:1-8.
213. Peruzzo DC, Benatti BB, Ambrosano GM, Nogueira-Filho GR, Sallum EA, Casati MZ, Nociti Jr FH. A systematic review of stress and psychological factors as possible risk factors for periodontal disease. *Journal of periodontology*. 2007, 78:1491-1504.
214. Gomes P, Soares-da-Silva P. L-DOPA transport properties in an immortalised cell line of rat capillary cerebral endothelial cells, RBE 4. *Brain research*. 1999, 829:143-150.
215. Palaoğlu S, Beşkonaklı E. Pineal bez ve yaşlanma. *Turkish Journal of Geriatrics*. 1998, 1:13-18.
216. Cardinali DP, Pévet P. Basic aspects of melatonin action. *Sleep medicine reviews*. 1998, 2:175-190.
217. Claustrat B, Brun J, Chazot G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep medicine reviews*. 2005, 9:11-24.
218. Mollaoğlu H, fehmi ÖZGÜNER M. Yaşlanma sürecinde melatoninin rolü. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*. 2005, 12:52-56.
219. Acuña-Castroviejo D, Escames G, Venegas C, Díaz-Casado ME, Lima-Cabello E, López LC, Rosales-Corral S, Tan D-X, Reiter RJJC, sciences ml. Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. 2014, 71:2997-3025.
220. Macchi MM, Bruce JN. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Frontiers in neuroendocrinology*. 2004, 25:177-195.
221. Scheer F, Czeisler CA. Melatonin, sleep, and circadian rhythms. *Sleep Med Rev*. 2005, 9:5-9.
222. Tsuzuki K, Okamoto-Mizuno K, Mizuno K. Effects of humid heat exposure on sleep, thermoregulation, melatonin, and microclimate. *Journal of thermal biology*. 2004, 29:31-36.
223. Cagnacci A. Melatonin in relation to physiology in adult humans: Mini Review. *Journal of pineal research*. 1996, 21:200-213.
224. Voordouw B, Euser R, Verdonk RE, Alberda BT, de Jong FH, Drogendijk AC, Fauser B, Cohen M. Melatonin and melatonin-progestin combinations alter pituitary-ovarian function in women and can inhibit ovulation. *The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*. 1992, 74:108-117.
225. Liebmann PM, Wölfler A, Felsner P, Hofer D, Schauenstein K. Melatonin and the immune system. *International archives of allergy immunology today*. 1997, 112:203-211.
226. Öztürk G, Coşkun Ş, Erbaş D, Hasanoglu E. The effect of melatonin on liver superoxide dismutase activity, serum nitrate and thyroid hormone levels. *The Japanese journal of physiology*. 2000, 50:149-153.
227. Singh M, Jadhav HR. Melatonin: functions and ligands. *Drug discovery today*. 2014, 19:1410-1418.
228. Reiter R. Interactions of the pineal hormone melatonin with oxygen-centered free radicals: a brief review. *Brazilian journal of medical biological research*. 1993, 26:1141-1155.
229. Meki A-RM, Hussein AA. Melatonin reduces oxidative stress induced by ochratoxin A in rat liver and kidney. *Comparative Biochemistry Physiology Part C: Toxicology Pharmacology*. 2001, 130:305-313.

230. IGUCHI H, Kato K-I, IBAYASHI H. Age-dependent reduction in serum melatonin concentrations in healthy human subjects. *The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*. 1982, 55:27-29.

231. Poeggeler B, Reiter RJ, Tan DX, Chen LD, Manchester LC. Melatonin, hydroxyl radical-mediated oxidative damage, and aging: a hypothesis. *Journal of pineal research*. 1993, 14:151-168.
232. Reiter RJ. The ageing pineal gland and its physiological consequences. *Bioessays*. 1992, 14:169-175.
233. Anisimov VN, Khavinson V, Morozov VG. Twenty years of study on effects of pineal peptide preparation: epithalamin in experimental gerontology and oncology. *Ann N Y Acad Sci*. 1994, 719:483-493.
234. Atasoy ÖB, Erbaş O. Melatonin hormonunun fizyolojik etkileri. *İstanbul Bilim Üniversitesi Florence Nightingale Tıp Dergisi* 2017, 3:52-62.

235. Hotchkiss AK, Nelson RJ. Melatonin and immune function: hype or hypothesis? *Critical Reviews™ in Immunology*. 2002, 22.
236. Guerrero JM, Reiter RJ. Melatonin-immune system relationships. *Current topics in medicinal chemistry*. 2002, 2:167-179.
237. Tresguerres J, Mendez LP, Lopez-Calderon A, Esquifino A. Possible role of prolactin in the inhibitory effect of testosterone on the hypothalamic-pituitary-testicular axis in the rat. *Journal of endocrinology*. 1985, 105:423-427.
238. Wei W, Shen Y-X, Dai M, Chen Q. Effects and mechanisms of melatonin on immune responses in mice of different months. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2003, 24:719-723.
239. Chen Q, Wei W. Effects and mechanisms of melatonin on inflammatory and immune responses of adjuvant arthritis rat. *International immunopharmacology*. 2002, 2:1443-1449.
240. Rohr UD, Herold J. Melatonin deficiencies in women. *Maturitas*. 2002, 41:85-104.
241. Maestroni GJ. The immunotherapeutic potential of melatonin. *Expert opinion on investigational drugs*. 2001, 10:467-476.
242. Tinto M, Sartori M, Pizzi I, Verga A, Longoni S. Melatonin as host modulating agent supporting nonsurgical periodontal therapy in patients affected by untreated severe periodontitis: A preliminary randomized, triple-blind, placebo-controlled study. *J Periodontal Res*. 2020, 55:61-67.
243. Najeeb S, Khurshid Z, Zohaib S, Zafar MS. Therapeutic potential of melatonin in oral medicine and periodontology. *The Kaohsiung journal of medical sciences*. 2016, 32:391-396.
244. Reiter R, Rosales-Corral S, Liu X, Acuna-Castroviejo D, Escames G, Tan DX. Melatonin in the oral cavity: physiological and pathological implications. *Journal of periodontal research*. 2015, 50:9-17.
245. Permuy M, López-Peña M, González-Cantalapiedra A, Muñoz F. Melatonin: A review of its potential functions and effects on dental diseases. *Int J Mol Sci*. 2017, 18:865.
246. Cutando A, Galindo P, Gómez-Moreno G, Arana C, Bolanos J, Acuña-Castroviejo D, Wang HL. Relationship between salivary melatonin and severity of periodontal disease. *Journal of periodontology*. 2006, 77:1533-1538.
247. ZAMINI A, Ragerdi KI, Barbarestani M, Hedayatpour A, Mahmoudi R, FARZANEHNEZHAD A. Osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells from

adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells: melatonin as a differentiation factor. 2008.
248. Kara A, Akman S, Ozkanlar S, Tozoglu U, Kalkan Y, Canakci CF, Tozoglu S. Immune modulatory and antioxidant effects of melatonin in experimental periodontitis in rats. *Free Radical Biology Medicine*. 2013, 55:21-26.

249. Arabacı T, Kermen E, Özkanlar S, Köse O, Kara A, Kızıldağ A, Duman ŞB, Ibişoğlu E. Therapeutic effects of melatonin on alveolar bone resorption after experimental periodontitis in rats: a biochemical and immunohistochemical study. *J Periodontol*. 2015, 86:874-881.
250. Srinath R, Acharya AB, Thakur SL. Salivary and gingival crevicular fluid melatonin in periodontal health and disease. *J Periodontol*. 2010, 81:277-283.
251. Chen Y, Feng X, Hu X, Sha J, Li B, Zhang H, Fan H. Dexmedetomidine Ameliorates Acute Stress-Induced Kidney Injury by Attenuating Oxidative Stress and Apoptosis through Inhibition of the ROS/JNK Signaling Pathway. *Oxid Med Cell Longev*. 2018, 2018:4035310.
252. Guo Y, Sun J, Li T, Zhang Q, Bu S, Wang Q, Lai D. Melatonin ameliorates restraint stress-induced oxidative stress and apoptosis in testicular cells via NF-κB/iNOS and Nrf2/ HO-1 signaling pathway. *Sci Rep*. 2017, 7:9599.
253. McIntosh LJ, Sapolsky RM. Glucocorticoids increase the accumulation of reactive oxygen species and enhance adriamycin-induced toxicity in neuronal culture. *Exp Neurol*. 1996, 141:201-206.
254. Liu J, Wang X, Shigenaga MK, Yeo HC, Mori A, Ames BN. Immobilization stress causes oxidative damage to lipid, protein, and DNA in the brain of rats. *Faseb j*. 1996, 10:1532-1538.
255. Kim ST, Choi JH, Chang JW, Kim SW, Hwang O. Immobilization stress causes increases in tetrahydrobiopterin, dopamine, and neuromelanin and oxidative damage in the nigrostriatal system. *J Neurochem*. 2005, 95:89-98.
256. Konakchieva R, Mitev Y, Almeida OF, Patchev VK. Chronic melatonin treatment counteracts glucocorticoid-induced dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. *Neuroendocrinology*. 1998, 67:171-180.
257. Raghavendra V, Kulkarni SK. Melatonin reversal of DOI-induced hypophagia in rats; possible mechanism by suppressing 5-HT(2A) receptor-mediated activation of HPA axis. *Brain Res*. 2000, 860:112-118.
258. BU L, LIU Z. Effects of melatonin on HPA axis in rats. *Acta Anatomica Sinica*. 1957.
259. Konakchieva R, Mitev Y, Almeida OF, Patchev VK. Chronic melatonin treatment and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in the rat: attenuation of the secretory response to stress and effects on hypothalamic neuropeptide content and release. *Biol Cell*. 1997, 89:587-596.
260. Medic G, Wille M, Hemels ME. Short- and long-term health consequences of sleep disruption. *Nat Sci Sleep*. 2017, 9:151-161.
261. Vega D, Maalouf NM, Sakhaee K. CLINICAL Review #: the role of receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANK)/RANK ligand/osteoprotegerin: clinical implications. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007, 92:4514-4521.
262. Kelly RR, McDonald LT, Jensen NR, Sidles SJ, LaRue AC. Impacts of Psychological Stress on Osteoporosis: Clinical Implications and Treatment Interactions. *Front Psychiatry*. 2019, 10:200.
263. Hasan KM, Rahman MS, Arif KM, Sobhani ME. Psychological stress and aging: role of glucocorticoids (GCs). *Age (Dordr)*. 2012, 34:1421-1433.

264. Hofbauer LC, Gori F, Riggs BL, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Khosla S. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology*. 1999, 140:4382-4389.
265. Rodrigues WF, Madeira MF, da Silva TA, Clemente-Napimoga JT, Miguel CB, Dias-da-Silva VJ, Barbosa-Neto O, Lopes AH, Napimoga MH. Low dose of propranolol down-modulates bone resorption by inhibiting inflammation and osteoclast differentiation. *Br J Pharmacol*. 2012, 165:2140-2151.
266. Deniz GY, Laloglu E, Altun S, Yiğit N, Gezer A. Antioxidant and anti-apoptotic effects of vitexilactone on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Biotechnic & Histochemistry*. 2020, 95:381-388.
267. Köse O, Kurt Bayrakdar S, Akyıldız K, Altın A, Arabacı T, Yemenoglu H, Zihni Korkmaz M, Köse TE, Türker Sener L, Mercantepe T. Melatonin ameliorates periodontitis-related inflammatory stress at cardiac left ventricular tissues in rats. *J Periodontol*. 2020, 91:1486-1494.
268. Köse O, Arabacı T, Yemenoglu H, Ozkanlar S, Kurt N, Gumussoy I, Gedikli S, Kara A. Influence of experimental periodontitis on cardiac oxidative stress in rats: a biochemical and histomorphometric study. *J Periodontal Res*. 2017, 52:603-608.
269. Bali A, Jaggi AS. Preclinical experimental stress studies: protocols, assessment and comparison. *Eur J Pharmacol*. 2015, 746:282-292.
270. Yang X, Zhang H, Wang J, Zhang Z, Li C. Puerarin decreases bone loss and collagen destruction in rats with ligature-induced periodontitis. *J Periodontal Res*. 2015, 50:748-757.
271. Liu L, Zhang C, Hu Y, Peng B. Protective effect of metformin on periapical lesions in rats by decreasing the ratio of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand/osteoprotegerin. *J Endod*. 2012, 38:943-947.
272. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1990, 186:421-431.
273. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*. 1959, 82:70-77.
274. Fan SJ, Jiang H, Yang LJ, Liu X, Song J, Pan F. Effects of adrenergic agents on stress-induced brain microstructural and immunochemical changes in adult male Wistar rats. *Ann Anat*. 2011, 193:418-424.
275. Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol*. 2003, 463:3-33.
276. Walsh RN, Cummins RA. The Open-Field Test: a critical review. *Psychol Bull*. 1976, 83:482-504.
277. Binder E, Droste SK, Ohl F, Reul JM. Regular voluntary exercise reduces anxiety-related behaviour and impulsiveness in mice. *Behav Brain Res*. 2004, 155:197-206.
278. Lieben CK, van Oorsouw K, Deutz NE, Blokland A. Acute tryptophan depletion induced by a gelatin-based mixture impairs object memory but not affective behavior and spatial learning in the rat. *Behav Brain Res*. 2004, 151:53-64.
279. Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Animal models for periodontal regeneration and peri-implant responses. *Periodontol 2000*. 2015, 68:66-82.
280. Graves DT, Fine D, Teng YT, Van Dyke TE, Hajishengallis G. The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. *J Clin Periodontol*. 2008, 35:89-105.
281. Graves DT, Kang J, Andriankaja O, Wada K, Rossa C, Jr. Animal models to study host-bacteria interactions involved in periodontitis. *Front Oral Biol*. 2012, 15:117-132.
282. Bjornsson TD, Callaghan JT, Einolf HJ, Fischer V, Gan L, Grimm S, Kao J, King SP, Miwa G, Ni L, Kumar G, McLeod J, Obach RS, Roberts S, Roe A, Shah A, Snikeris

F, Sullivan JT, Tweedie D, Vega JM, Walsh J, Wrighton SA. The conduct of in vitro and in vivo drug-drug interaction studies: a Pharmaceutical Research and Manufacturers of America (PhRMA) perspective. *Drug Metab Dispos*. 2003, 31:815-832.
283. Kuhr A, Popa-Wagner A, Schmoll H, Schwahn C, Kocher T. Observations on experimental marginal periodontitis in rats. *J Periodontal Res*. 2004, 39:101-106.
284. Kose O, Kurt Bayrakdar S, Unver B, Altin A, Akyildiz K, Mercantepe T, Bostan SA, Arabaci T, Turker Sener L, Emre Kose T, Tumkaya L, Yilmaz A, Kuluslu G. Melatonin improves periodontitis-induced kidney damages by decreasing inflammatory stress and apoptosis in rats. *J Periodontol*. 2020.
285. Jaggi AS, Bhatia N, Kumar N, Singh N, Anand P, Dhawan R. A review on animal models for screening potential anti-stress agents. *Neurol Sci*. 2011, 32:993-1005.
286. Conrad CD, LeDoux JE, Magariños AM, McEwen BS. Repeated restraint stress facilitates fear conditioning independently of causing hippocampal CA3 dendritic atrophy. *Behav Neurosci*. 1999, 113:902-913.
287. Gawrylewski A. The trouble with animal models. *Scientist (Philadelphia, Pa)*. 2007, 21:45-51.
288. Glavin GB, Paré WP, Sandbak T, Bakke HK, Murison R. Restraint stress in biomedical research: an update. *Neurosci Biobehav Rev*. 1994, 18:223-249.
289. Lin R, Wang Z, Cao J, Gao T, Dong Y, Chen Y. Role of melatonin in intestinal mucosal injury induced by restraint stress in mice. *Pharm Biol*. 2020, 58:342-351.
290. Wu L, Lu Y, Jiao Y, Liu B, Li S, Li Y, Xing F, Chen D, Liu X, Zhao J, Xiong X, Gu Y, Lu J, Chen X, Li X. Paternal Psychological Stress Reprograms Hepatic Gluconeogenesis in Offspring. *Cell Metab*. 2016, 23:735-743.
291. Buynitsky T, Mostofsky DI. Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments. *Neurosci Biobehav Rev*. 2009, 33:1089-1098.
292. Jeong YH, Park CH, Yoo J, Shin KY, Ahn SM, Kim HS, Lee SH, Emson PC, Suh YH. Chronic stress accelerates learning and memory impairments and increases amyloid deposition in APPV717I-CT100 transgenic mice, an Alzheimer's disease model. *Faseb j*. 2006, 20:729-731.
293. Grandin T, Deesing M. Distress in animals: is it fear, pain or physical stress? : Colorado State University. Libraries; 2002.
294. Foureaux Rde C, Messora MR, de Oliveira LF, Napimoga MH, Pereira AN, Ferreira MS, Pereira LJ. Effects of probiotic therapy on metabolic and inflammatory parameters of rats with ligature-induced periodontitis associated with restraint stress. *J Periodontol*. 2014, 85:975-983.
295. Semenoff Segundo A, Semenoff TA, Borges AH, Pedro FL, Sakai VT. Methodological model of chronic stress associated with ligature-induced periodontitis in rats: a radiographic study. *Braz Oral Res*. 2010, 24:455-459.
296. Takeda O, Toyama T, Watanabe K, Sato T, Sasaguri K, Akimoto S, Sato S, Kawata T, Hamada N. Ameliorating effects of Juzentaihoto on restraint stress and P. gingivalis-induced alveolar bone loss. *Arch Oral Biol*. 2014, 59:1130-1138.
297. Benatti BB, Nogueira-Filho GR, Diniz MC, Sallum EA, Sallum AW, Nociti FH, Jr. Stress may enhance nicotine effects on periodontal tissues. An in vivo study in rats. *J Periodontal Res*. 2003, 38:351-353.
298. Rettori E, De Laurentiis A, Zorrilla Zubilete M, Rettori V, Elverdin JC. Anti-inflammatory effect of the endocannabinoid anandamide in experimental periodontitis and stress in the rat. *Neuroimmunomodulation*. 2012, 19:293-303.
299. Gaspersic R, Stiblar-Martincic D, Skaleric U. Influence of restraint stress on ligature-induced periodontitis in rats. *Eur J Oral Sci*. 2002, 110:125-129.

300. Ottenweller JE, Natelson BH, Pitman DL, Drastal SD. Adrenocortical and behavioral responses to repeated stressors: toward an animal model of chronic stress and stress-related mental illness. *Biol Psychiatry*. 1989, 26:829-841.
301. Birmann PT, Domingues M, Casaril AM, Smaniotto T, Hartwig D, Jacob RG, Savegnago L. A pyrazole-containing selenium compound modulates neuroendocrine, oxidative stress, and behavioral responses to acute restraint stress in mice. *Behav Brain Res*. 2021, 396:112874.
302. D'Amico R, Siracusa R, Fusco R, Cordaro M, Genovese T, Peritore AF, Gugliandolo E, Crupi R, Impellizzeri D, Cuzzocrea S, Paola RD. Protective effects of Colomast(®), A New Formulation of Adelmidrol and Sodium Hyaluronate, in A Mouse Model of Acute Restraint Stress. *Int J Mol Sci*. 2020, 21.
303. Nollet M, Hicks H, McCarthy AP, Wu H, Möller-Levet CS, Laing EE, Malki K, Lawless N, Wafford KA, Dijk DJ, Winsky-Sommerer R. REM sleep's unique associations with corticosterone regulation, apoptotic pathways, and behavior in chronic stress in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019, 116:2733-2742.
304. Sanford LD, Fang J, Tang X. Sleep after differing amounts of conditioned fear training in BALB/cJ mice. *Behav Brain Res*. 2003, 147:193-202.
305. Palagini L, Baglioni C, Ciapparelli A, Gemignani A, Riemann D. REM sleep dysregulation in depression: state of the art. *Sleep Med Rev*. 2013, 17:377-390.
306. Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Spence DW, Cardinali DP. Role of the melatonin system in the control of sleep: therapeutic implications. *CNS Drugs*. 2007, 21:995-1018.
307. Ferracioli-Oda E, Qawasmi A, Bloch MH. Meta-analysis: melatonin for the treatment of primary sleep disorders. *PLoS One*. 2013, 8:e63773.
308. Buscemi N, Vandermeer B, Hooton N, Pandya R, Tjosvold L, Hartling L, Baker G, Klassen TP, Vohra S. The efficacy and safety of exogenous melatonin for primary sleep disorders. A meta-analysis. *J Gen Intern Med*. 2005, 20:1151-1158.
309. Dalcico R, de Menezes AM, Deocleciano OB, Oriá RB, Vale ML, Ribeiro RA, Brito GA. Protective mechanisms of simvastatin in experimental periodontal disease. *J Periodontol*. 2013, 84:1145-1157.
310. Li X, Wu X, Ma Y, Hao Z, Chen S, Fu T, Chen H, Wang H. Oral administration of 5-hydroxytryptophan aggravated periodontitis-induced alveolar bone loss in rats. *Arch Oral Biol*. 2015, 60:789-798.
311. Zhou T, Chen D, Li Q, Sun X, Song Y, Wang C. Curcumin inhibits inflammatory response and bone loss during experimental periodontitis in rats. *Acta Odontol Scand*. 2013, 71:349-356.
312. De Almeida J, Ervolino E, Bonfietti LH, Novaes VC, Theodoro LH, Fernandes LA, Martins TM, Faleiros PL, Garcia VG. Adjuvant Therapy With Sodium Alendronate for the Treatment of Experimental Periodontitis in Rats. *J Periodontol*. 2015, 86:1166-1175.
313. Chen H, Fu T, Ma Y, Wu X, Li X, Li X, Shen J, Wang H. Intermittent administration of parathyroid hormone ameliorated alveolar bone loss in experimental periodontitis in streptozotocin-induced diabetic rats. *Arch Oral Biol*. 2017, 83:76-84.
314. Tamaki N, Cristina Orihuela-Campos R, Inagaki Y, Fukui M, Nagata T, Ito HO. Resveratrol improves oxidative stress and prevents the progression of periodontitis via the activation of the Sirt1/AMPK and the Nrf2/antioxidant defense pathways in a rat periodontitis model. *Free Radic Biol Med*. 2014, 75:222-229.
315. Köse O, Arabaci T, Kizildag A, Erdemci B, Özkal Eminoğlu D, Gedikli S, Özkanlar S, Zihni M, Albayrak M, Kara A. Melatonin prevents radiation-induced

oxidative stress and periodontal tissue breakdown in irradiated rats with experimental periodontitis. *J Periodontal Res*. 2017, 52:438-446.
316. Köse O, Kurt Bayrakdar S, Akyıldız K, Altın A, Arabacı T, Yemenoglu H, Zihni Korkmaz M, Köse TE, Türker Sener L, Mercantepe T, Tümkaya L, Yılmaz A. Melatonin ameliorates periodontitis-related inflammatory stress at cardiac left ventricular tissues in rats. *J Periodontol*. 2020, 91:1486-1494.
317. Fedchenko N, Reifenrath J. Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry analysis results in the bone tissue - a review. *Diagn Pathol*. 2014, 9:221.
318. Tsang ML, Weatherbee JA. Cytokine assays and their limitations. *Aliment Pharmacol Ther*. 1996, 10 Suppl 2:55-61; discussion 62.
319. Graves D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *J Periodontol*. 2008, 79:1585-1591.
320. Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontol 2000*. 1997, 14:112-143.
321. Haroon E, Raison CL, Miller AH. Psychoneuroimmunology meets neuropsychopharmacology: translational implications of the impact of inflammation on behavior. *Neuropsychopharmacology*. 2012, 37:137-162.
322. Johannsen A, Rylander G, Söder B, Asberg M. Dental plaque, gingival inflammation, and elevated levels of interleukin-6 and cortisol in gingival crevicular fluid from women with stress-related depression and exhaustion. *J Periodontol*. 2006, 77:1403-1409.
323. Yang EV, Bane CM, MacCallum RC, Kiecolt-Glaser JK, Malarkey WB, Glaser R. Stress-related modulation of matrix metalloproteinase expression. *J Neuroimmunol*. 2002, 133:144-150.
324. Bossé M, Chakir J, Rouabhia M, Boulet LP, Audette M, Laviolette M. Serum matrix metalloproteinase-9:Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio correlates with steroid responsiveness in moderate to severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999, 159:596-602.
325. Alexander JP, Samples JR, Acott TS. Growth factor and cytokine modulation of trabecular meshwork matrix metalloproteinase and TIMP expression. *Curr Eye Res*. 1998, 17:276-285.
326. Burger D, Rezzonico R, Li JM, Modoux C, Pierce RA, Welgus HG, Dayer JM. Imbalance between interstitial collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in synoviocytes and fibroblasts upon direct contact with stimulated T lymphocytes: involvement of membrane-associated cytokines. *Arthritis Rheum*. 1998, 41:1748-1759.
327. Bond M, Fabunmi RP, Baker AH, Newby AC. Synergistic upregulation of metalloproteinase-9 by growth factors and inflammatory cytokines: an absolute requirement for transcription factor NF-kappa B. *FEBS Lett*. 1998, 435:29-34.
328. Marrocco I, Altieri F, Peluso I. Measurement and Clinical Significance of Biomarkers of Oxidative Stress in Humans. *Oxid Med Cell Longev*. 2017, 2017:6501046.
329. Zhang H, Wei M, Sun Q, Yang T, Lu X, Feng X, Song M, Cui L, Fan H. Lycopene ameliorates chronic stress-induced hippocampal injury and subsequent learning and memory dysfunction through inhibiting ROS/JNK signaling pathway in rats. *Food Chem Toxicol*. 2020, 145:111688.
330. Spiers JG, Chen HJ, Sernia C, Lavidis NA. Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal stress axis induces cellular oxidative stress. *Front Neurosci*. 2014, 8:456.

331. Chetty S, Friedman AR, Taravosh-Lahn K, Kirby ED, Mirescu C, Guo F, Krupik D, Nicholas A, Geraghty A, Krishnamurthy A, Tsai MK, Covarrubias D, Wong A, Francis D, Sapolsky RM, Palmer TD, Pleasure D, Kaufer D. Stress and glucocorticoids promote oligodendrogenesis in the adult hippocampus. *Mol Psychiatry*. 2014, 19:1275-1283.
332. Wang W, Esbensen Y, Kunke D, Suganthan R, Rachek L, Bjørås M, Eide L. Mitochondrial DNA damage level determines neural stem cell differentiation fate. *J Neurosci*. 2011, 31:9746-9751.
333. Tomofuji T, Ekuni D, Irie K, Azuma T, Tamaki N, Maruyama T, Yamamoto T, Watanabe T, Morita M. Relationships between periodontal inflammation, lipid peroxide and oxidative damage of multiple organs in rats. *Biomed Res*. 2011, 32:343-349.
334. Watanobe H, Anzai J, Nigawara T, Habu S, Takebe K. Effects of gender and gonadectomy on ACTH response to interleukin-1beta in the rat: comparison with the modulation of ACTH response to immobilization stress. *Neuroimmunomodulation*. 1996, 3:254-258.
335. Aloisi AM, Ceccarelli I, Lupo C. Behavioural and hormonal effects of restraint stress and formalin test in male and female rats. *Brain Res Bull*. 1998, 47:57-62.

EKLER

EK-1-Özgeçmiş

Kişisel Bilgiler
Adı Soyadı : Semih Alperen Bostan
Eğitim
Lise : Kanuni Anadolu Lisesi (2006-2010) **Lisans** : Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi (2011-2016) **Uzmanlık** : Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Periodontoloji Anabilim Dalı (2018-2021)
Yabancı Dil Bilgisi
İngilizce