

T.C.
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
PERİODONTOLOJİ ANABİLİDİM DALI



DENEYSEL PERİODONTİTİS OLUŞTURULAN SIÇANLARDA ARI
POLENİNİN ALVEOLAR KEMİK YIKIMI VE İNFLAMATUVAR
PARAMETRELER ÜZERİNDE ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

SENEM FİLİZ

TEZ DANIŞMANI
Dr. Öğr. Üyesi Nuray ERCAN

BOLU, OCAK - 2025

KABUL VE ONAY SAYFASI

SENEM FİLİZ tarafından hazırlanan “**DENEYSEL PERİODONTİTİS OLUŞTURULAN SIÇANLARDA ARI POLENİNİN ALVEOLAR KEMİK YIKIMI VE İNFLAMATUVAR PARAMETRELER ÜZERİNDE ETKİSİ**” adlı tez çalışması jürimiz tarafından Periodontoloji Anabilim Dalı’nda Uzmanlık Tezi olarak oy birliği/ oy çokluğuyla kabul edilmiştir. 20/01/2025

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi NURAY ERCAN
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

.....

Üye
Doç. Dr. Gülbahar USTAOĞLU
Sağlık Bilimleri Üniversitesi

.....

Üye
Dr. Öğr. Üyesi Esra ATEŞ YILDIRIM
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

.....

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. İbrahim KÜRTÜL
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu bildirir,

aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Teze ilişkin Turnitin adlı programında enstitü müdürlüğünce belirlenen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan benzerlik raporuna göre, tezin benzerlik oranı %30'u geçmemektedir.

Bu çalışma için Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Hayvan Araştırmaları Yerel Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır. (Karar numarası: 2024/11)

SENEM FİLİZ

ÖZET

**DENEYSEL PERİODONTİTİS OLUŞTURULAN SIÇANLARDA ARI
POLENİNİN ALVEOLAR KEMİK YIKIMI VE İNFLAMATUVAR
PARAMETRELER ÜZERİNDE ETKİSİ
PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI UZMANLIK TEZİ
SENEM FİLİZ
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: DR. ÖĞR. ÜYESİ NURAY ERCAN)**

BOLU, OCAK - 2025

Arı poleni, bitki çiçeklerinden elde edilen polen ve arı tükürük salgılarının bir karışımı olup, esas olarak anti-inflamatuar etkiye sahip bir arı ürünüdür. Arı poleni Antimikrobiyal ve antioksidan özelliklere sahiptir. Arı polenin metanolik ekstraktında bulunan flavonoidler, nitrik oksit üretimini azaltarak siklooksijenaz aktivitesini inhibe etmekte ve ek olarak kemik kaybını azaltmaktadır. Bu nedenlerle, arı poleni, kronik hastalıklarla ilişkili moleküller ve hücresel değişiklikler üzerinde olumlu özelliktedir ve önleyici/tedavi edici potansiyel bir terapötik maddedir. Bu çalışmanın amacı sıçanlarda oral gavaj ile uygulanan arı polenin deneysel periodontitis (DP) üzerinde etkilerini araştırmaktır.

Yirmi dört adet sıçan rastgele üç gruba ayrıldı; 1) periodontal olarak sağlıklı (PS), 2) deneysel periodontitis (DP), 3) deneysel periodontitis + arı poleni (DP-AP). Sıçanların maksiller azı dişlerine ligatür yerleştirilmesi ile DP indüklenmesi sonrasında test grubuna arı poleni oral gavaj yoluyla 14 gün boyunca uygulandı. Sıçanlar 15. günde ötenazi yapılarak çene örnekleri ve serum örnekleri elde edildi. Örnekler biyokimyasal, histolojik, histomorfometrik ve immunohistokimyasal olarak analiz edildi. Serumda IL-4 ve IL-6 düzeyleri enzim bağı immunosorbent assay (ELISA) ile değerlendirildi. NF- κ B ligandı reseptör aktivatörü (RANKL), osteoprotegerin (OPG) seviyeleri immün boyama ile analiz edildi.

Deneysel periodontitis oluşturulan gruplarda periodontal olarak sağlıklı gruba göre daha fazla kemik kaybı olduğu fakat bu farkın anlamlı olmadığı saptandı ($p>0.05$). Gruplar arası serum IL-4 ve IL-6 düzeylerinde anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). İmmunohistokimyasal değerlendirmede, DP-AP grubunda DP grubuna göre, OPG seviyesinin anlamlı daha yüksek, RANKL seviyesinin ise anlamlı daha düşük olduğu tespit edildi ($p<0.05$). Histopatolojik değerlendirmede inflamasyon düzeyinin ise DP-AP grubunda, DP grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı olarak daha düşük olduğu saptandı ($p<0.05$).

Bu çalışmanın sınırları dahilinde, sistemik arı poleni uygulamasının serum IL-4 ve IL-6 parametreleri üzerinde etkisinin olmadığı, RANKL düzeylerini azalttığı, OPG düzeylerini arttırdığı bu sebeple alveolar kemik kaybını önleyebileceği diğer taraftan da bu durumun histomorfometrik ölçümler ile desteklenmediği sonuçları belirlendi.

ANAHTAR KELİMELEER: Alveolar kemik kaybı, Anti-inflamatuar, Deneysel periodontitis, Arı poleni, OPG, RANKL, IL-4, IL-6



ABSTRACT

THE EFFECT OF BEE POLLEN ON ALVEOLAR BONE DESTRUCTION AND INFLAMMATORY PARAMETERS IN RATS WITH EXPERIMENTAL PERIODONTITIS

DEPARTMENT OF PERIODONTOLOGY SPECIALIZATION THESIS

SENEM FİLİZ

BOLU ABANT İZZET BAYSAL UNIVERSITY

DEPARTMENT OF PERIODONTOLOGY

(SUPERVISOR: ASSIST. PROF. DR. NURAY ERCAN)

BOLU, JANUARY 2025

Bee pollen is a mixture of pollen from plant flowers and bee salivary secretions, primarily known for its anti-inflammatory effects. It has antimicrobial and antioxidant properties. The flavonoids found in the methanolic extract of bee pollen inhibit cyclooxygenase activity by reducing nitric oxide production, thereby additionally reducing bone loss. For these reasons, bee pollen has beneficial properties related to molecules and cellular changes associated with chronic diseases and is a potential therapeutic substance with preventive/treatment potential. The aim of this study is to investigate the effects of bee pollen administered via oral gavage on experimental periodontitis (EP) in rats.

Twenty-four rats were randomly divided into three groups: 1) periodontal healthy (PH), 2) experimental periodontitis (EP), 3) experimental periodontitis + bee pollen (EP-BP). After the induction of EP by placing ligatures on the maxillary molars of the rats, bee pollen was administered via oral gavage to the test group for 14 days. The rats were euthanized on day 15, and jaw and serum samples were collected. The samples were analyzed biochemically, histologically, histomorphometrically, and immunohistochemically. Serum levels of IL-4 and IL-6 were evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) levels were analyzed by immunostaining.

In the experimental periodontitis groups, more bone loss was observed compared to the periodontal healthy group; however, this difference was not statistically significant ($p>0.05$). No significant differences were found between groups in serum IL-4 and IL-6 levels ($p>0.05$). Immunohistochemical analysis showed that in the EP-BP group, OPG levels were significantly higher and RANKL levels were significantly lower compared to the EP group ($p<0.05$). Histopathological evaluation revealed that the inflammation level in the EP-BP group was statistically significantly lower than in the EP group ($p<0.05$).

Within the limitations of this study, it was determined that systemic bee pollen administration had no effect on serum IL-4 and IL-6 parameters, reduced RANKL levels, increased OPG levels, and thus may prevent alveolar bone loss. However, this was not supported by histomorphometric measurements.

KEYWORDS: Alveolar bone loss, Anti-inflammatory, Experimental periodontitis, Bee pollen, OPG, RANKL, IL-4, IL-6



İÇİNDEKİLER

Sayfa

KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
ETİK BEYAN.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	xi
TABLO LİSTESİ	xii
FOTOĞRAF LİSTESİ	xiii
KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ	xiv
TEŞEKKÜR	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1 Periodontal Hastalık	4
2.2 Biyofilm ve Mikrobiyal Plak.....	8
2.3 Periodontal Hastalığın Histopatolojisi.....	9
2.3.1 Periodontitis ve Konak Yanıtı	12
2.3.2 Alveolar Kemik Yıkımı	19
2.4 Periodontitis Tedavisinde Konak Modülasyonu.....	23
2.5 Periodontal Hastalığın Tedavisi ve Apiterapi.....	26
2.6 Periodontitis Tedavisinde Potansiyel Terapötik Ajan: Arı Poleni.....	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM	33
3.1 Deney Hayvanlarının Bakım Koşulları	33
3.2 Çalışma Gruplarının Belirlenmesi	33
3.3 Deneysel Periodontitis Oluşturulması ve Çalışma Protokolü.....	34
Arı Poleninin Hazırlanması ve Doz Ayarlanması	35
3.4 Histolojik Değerlendirme	37
3.4.1 Histopatolojik Değerlendirme	37
3.4.2 Histomorfometrik Değerlendirme	37
3.4.3 İmmunohistokimyasal Değerlendirme	38
3.5 Biyokimyasal Değerlendirme	39
3.6 İstatistiksel Analiz	39
4. BULGULAR	40
4.1 Biyokimyasal Parametrelerin Değerlendirilmesi.....	40
4.1.1 Serum IL-6 ve IL-4 seviyelerinin değerlendirilmesi	40
4.2 Histolojik Parametrelerin Değerlendirilmesi.....	41
4.2.1 Histomorfometrik Değerlendirme	41
4.2.2 Histopatolojik Değerlendirme	43
4.2.3 İmmunohistokimyasal Değerlendirme	46

5. TARTIŞMA	51
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	61
7. KAYNAKLAR.....	63
8. EKLER.....	77



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 3-1. Deney Hayvanlarının Randomizasyonu.....	34
Şekil 3-2. Deney Aşamaları	36
Şekil 4-1. Çalışma gruplarındaki serum IL-6 (ng/L) ve serum IL-4 (ng/L) seviyelerini gösteren histogram grafikleri.....	41
Şekil 4-2. Histolojik kemik kaybı ölçümlerinin histogram grafiği.....	42
Şekil 4-3. Çalışma gruplarına göre inflamasyon skoru dağılımlarına ait kutu grafiği	44
Şekil 4-4. Çalışma gruplarına göre RANKL boyanma yoğunluğu dağılımına ait kutu grafiği.	47
Şekil 4-5. Çalışma gruplarına göre OPG boyanma yoğunluğu dağılımına ait kutu grafiği.	48

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 4-1. Çalışma gruplarındaki serum IL-6 (ng/L) ve IL-4 (ng/L) seviyeleri*41	
Tablo 4-2. Çalışma gruplarına göre histomorfometrik ölçümlerin dağılımları ve karşılaştırılması	42
Tablo 4-3. Çalışma gruplarına göre inflamasyon skorlarının dağılımları	44
Tablo 4-4. Çalışma gruplarına göre immunhistokimyasal değerlendirmede RANKL boyanma yoğunluğu	46
Tablo 4-5. Çalışma gruplarına göre immunhistokimyasal değerlendirmede OPG boyanma yoğunluğu	47

FOTOĞRAF LİSTESİ

Sayfa

Fotoğraf 3-1. Deneysel Periodontitis Modeli.....	34
Fotoğraf 3-2. Arı poleninin oral gavaj yolu ile verilmesi	35
Fotoğraf 3-3. Arı poleni çözeltisi.....	36
Fotoğraf 4-1. Alveolar kemik kaybının ölçümleri, H&E boyama,40x büyütme.	43
Fotoğraf 4-2. Işık mikroskobu altında gruplara göre inflamasyon ve alveolar kemik kayıpları, H&E boyama, 100x büyütme.	45
Fotoğraf 4-3. Işık mikroskobunda gruplara göre RANKL immün boyanmasına ait histolojik kesitler, 400X büyütme.	49
Fotoğraf 4-4. Işık mikroskobunda gruplara göre OPG immün boyanmasına ait histolojik kesitler, 400X büyütme.	50

KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ

µm	: Mikrometre
COX	: Siklooksijenaz
CRP	: C- reaktif protein
DOS	: Dişeti oluğu sıvısı
DP	: Deneysel periodontitis
ECM	:Ekstrasellüler matriks
HE	: Hematoksilen Eozin
IFN-α	: İnterferon alfa
IFN-gama	: İnterferon gama
IL-1	: İnterlökin 1
IL-1α	: İnterlökin 1 alfa
IL-1β	: İnterlökin 1 beta
IL-4	: İnterlökin 4
IL-6	: İnterlökin 6
IL-10	: İnterlökin 10
IL-12	: İnterlökin 12
IL-13	: İnterlökin 13
LOX	: Lipooksijenaz
LPS	: Lipopolisakkarit
MMP-8	: Matriks metalloproteinaz 8
MMP-9	: Matriks metalloproteinaz 9
MRJP-3	: Major royal jelly protein 3
Nd:YAG	: Neodymium: Yitrium-Aluminium-Garnet
NF-Kb	: Nükleer Faktör Kappa B
NSAID	: Non-steroid Anti-inflamatuar
OPG	: Osteoprotegerin
PAMP	: Patojen ilişkili moleküler patern
PGE2	: Prostaglandin E2
P. gingivalis	: Porphyromonas gingivalis
PRR	: Patern tanıma reseptörleri

RANKL : Reseptör aktivator nükleer kappa B Ligand

ROS : Reaktif oksijen türleri

rpm : Dakikada devir sayısı

SDD : Subantimikrobiyal doz doksisiklin

T. forsythia : Tannarella forsythia

TGF- β : Transforming growth factor-beta

TNF- α : Tümör nekroz faktörü alfa

TNF- β : Tümör nekroz faktörü beta

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor



TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince ve bu çalışmanın hazırlanmasında bana her konuda destek olan, klinik ve akademik bilgi ve deneyimleriyle bana rehberlik eden değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Nuray ERCAN'a,

Bu çalışmayı gerçekleştirmemizde her türlü bilgi ve yardımlarıyla katkıda bulunan Sayın Dr. Öğr. Üyesi Esra ATEŞ YILDIRIM'a, ve bilgi ve deneyimleri ile uzmanlık eğitimi süresince yanımda olan değerli hocam Bilge MERACI YILDIRAN'a,

Uzmanlık eğitimine başladığımdan bu yana tüm bilgi ve deneyimlerini esirgmeden paylaştan ve klinikte keyifli bir çalışma ortamı sağlayan İlayda GÜNEY, Fatmanur Ezgi DOĞAN, Hatice Aysim LEYMUN ERKİN ve Işıl YALÇIN BİLKE'ye,

Huzurlu ve sıkıntılı her anda yardımları ve dostluklarıyla yanımda olan, beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum sevgili oda arkadaşlarım Utku BÖCÜOĞLU, Tuğba BULUT, Hilal KECEL TURAN ve Tuğçe ÇAĞIRAN GÜRBÜZ'e,

Tez çalışmam süresince özveri ve güler yüze destek olan, yardımlarını esirgemeyen kliniğimizin değerli personeli Tuba ENGİN ERTUNÇ, Sıdıka ALTAN, Ecemnur ÖZKAN ve kliniğimizin değerli ameliyathane ekibine,

Her zaman ve her konuda yanımda olan, hiçbir karşılık beklemeden beni her zaman seven, beni bugünlere getiren ve hayatım boyunca emeklerini esirgemeyen sevgili annem Sevda ÜNAL, sevgili abim Bahadır FİLİZ, değerli eşi Müge YÜKSEL FİLİZ, moral ve motivasyon kaynağım canım yeğenim Bade FİLİZ'e,

Bu sürecin tüm zorluklarını benimle birlikte yaşayan, desteğini ve sevgisini hep hissettiğim müstakbel eşim Ufuk ALTINKAYA ve değerli ALTINKAYA ailesine teşekkürü borç bilirim.

1. GİRİŞ

Periodontitis, diş yüzeylerinde biriken biyofilm ile konak savunma sisteminin arasındaki dengenin bozulmasıyla gelişen ve periodonsiyumu etkileyen enflamatuvar bir hastalıktır (1). Periodontitisin ortaya çıkışı ve gelişimi, bakteri ile konakçı arasındaki etkileşimin sonucudur. Periodontal doku yıkımı, oral bakteriyel enfeksiyonun neden olduğu inflamatuvar bir süreçle başlamaktadır (2). Primer etyolojik ajan olan bakteriyel plak, lokal bir tetikleyici olarak konakçıdaki inflamatuvar yanıtları başlatarak bir dizi inflamasyon sürecine yol açar. Bu dinamik etkileşim, uygun tedavi uygulanmadığı takdirde alveolar kemik kaybıyla sonuçlanabilir (3). Periodontitisli dokularda, TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-6, IL-12 ve gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin seviyelerinde belirgin bir artış gözlemlenirken, anti-inflamatuvar sitokinlerin (IL-4, IL-10 vb.) düzeylerinde ise azalma meydana gelmektedir (4). Konakçı hücreler ile patojenler arasındaki etkileşimler, aşırı sitokin üretimine yol açabilir. Özellikle IL-1 ve IL-6 gibi pro-inflamatuvar sitokinlerdeki artış periodontitisi tetiklerken, anti-inflamatuvar sitokinlerin hastalığın iyileşmesinde etkili olduğu bilinmektedir (5). Periodontisteki bu yıkım, bahsedilen pro-inflamatuvar medyatörlerin artması aracılığıyla, matriks metalloproteinaz enzimlerini salınımının ve osteoklast aktivitesinin artması ile ortaya çıkar (6). İnflamatuvar sitokin ağındaki dengesizlik, periodontal hastalık gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. Bu süreçte matriks metalloproteinaz enzimleri kollajen yıkımı ile bağ dokusunda harabiyete sebep olurken, ilerleyen süreçte bu yıkımı alveolar kemiğin rezorpsiyonu takip etmektedir. (7)

Kemik rezorpsiyonunun ana hücresi olan osteoklast, makrofaj koloni uyarıcı faktör, RANK ligandı ve osteoprotegerin gibi önemli sitokinlerin düzenleyici etkisiyle, monosit ve makrofaj öncüllerinden farklılaşır. İnflamasyonda yer alan Th1 tipi T hücreleri, B hücreleri, makrofajlar ve nötrofiller, pro-inflamatuvar mediatörlerin üretimini artırarak kemik kaybını teşvik eder (8). Kemik yıkımı, tümör nekroz faktör (TNF) reseptör grubuna ait üç ana bileşenin etkileşimiyle meydana gelir: RANK, RANKL ve OPG. (9). Bu bileşenlerin etkileşimi, özellikle periodontitis kaynaklı alveolar kemik kaybında önemli bir rol oynar (10). RANKL, osteoklastların gelişiminde ve aktivasyonunda kritik bir görev üstlenir; çünkü bu molekül, osteoklastların prekürsör hücrelerinin yüzeyindeki RANK reseptörüne

bağlanır. Diğer yandan, Osteoprotegerin (OPG), mezenkimal hücreler tarafından üretilen bir molekül olup, RANKL'ın RANK reseptörüne bağlanmasını engelleyerek kemik yıkımını kontrol altına alır. OPG, özellikle osteoblastlar tarafından salgılanan ve RANKL-RANK reseptör etkileşimini engelleyerek osteoklast oluşumunu ve kemik rezorpsiyonunu inhibe eden çözünür bir RANKL bağlayıcı reseptördür (11). Böylece, OPG osteoklast farklılaşması ve aktivasyonunu engelleyerek osteoklastogenezisi inhibe eder. RANKL kemik rezorpsiyonunu tetiklerken, OPG ise bunun aksine kemik metabolizmasında kemiği rezorpsiyona karşı koruyucu molekül olarak görev alır (9).

Geleneksel tedavi yaklaşımı, mikrobiyal plak ve bakteri ürünlerinin mekanik temizlikle uzaklaştırılmasını kapsar; ancak bazı vakalarda ek kemoterapötik ilaçların kullanımı ve yardımcı tedavi gerekebilmektedir. Son dönemde periodontal tedavinin modern yaklaşımlarından biri, konakçının inflamatuvar yanıtını kontrol altına alarak periodontal ligament ve alveoler kemikte oluşabilecek hasarları önlemeye yönelik stratejilerdir (12). Araştırmalar, periodontal sağlıklı uyumlu bir ortam yaratmak ve konak yanıtını etkili bir şekilde yönetmek amacıyla mekanik tedaviye ek olarak antimikrobiyal ve antiinflamatuvar ilaç kullanımının faydalı olabileceğini göstermektedir (13). Ancak, antibiyotiklerin bakteriyel ekosistem üzerindeki antimikrobiyal etkisi, bakteriyel direnç gelişme riski nedeniyle sınırlıdır. Ayrıca, periodontal hastalık sırasında konakçı ve patojen arasındaki etkileşimler, konak yanıtlarını destekleyecek diğer farmakolojik yöntemlerin gerekliliğini ortaya koymaktadır. Bu bağlamda, inflamatuvar yanıtı hedefleyen doğal ürünlerin araştırılması, ilaçların çoklu antipatojenik etkileri ve antibiyotik direnç gelişimini engellemeye yönelik potansiyeli nedeniyle umut verici bir alternatif olarak öne çıkmaktadır (14).

Farklı laboratuvar ve klinik araştırmalarda, bitki özleri ve arı ürünlerinin yumuşak ve sert doku üzerinde etkilerinin araştırılmış ve tedavi potansiyeli üzerinde çalışılmıştır. Apiterapi, antik çağlardan bu yana kullanılan arı ürünlerine dayalı bir tedavi yöntemidir (15). Bal arısı *Apis mellifera*'nın ürettiği bal, propolis, arı poleni, arı sütü ve arı ekmeği gibi ürünlerin tedavi ve sağlık amaçlı kullanımı, apiterapi olarak isimlendirilmektedir (16). Arı ürünlerinin kronik inflamasyon üzerindeki etkileri pek çok araştırmada incelenmiştir ve arı kovanı ürünlerinin,

özellikle kronik patofizyolojik süreçlerde faydalı olduğu bilinmektedir (15). Ayrıca, pek çok tıbbi bitkide bulunan fenolik bileşikler, inflamasyonla ilişkili rahatsızlıkların tedavisinde önemli bir rol oynamaktadır (17). Literatürde, propolis, arı sütü, bal, arı zehiri ve arı poleni gibi bal arısı ürünleri veya bunların içerdiği biyoaktif bileşenlerin, inflamatuvar mediatör üretimini düzenleyen terapötik potansiyeli olduğu bildirilmiştir. Bu bulgular, arı ürünlerinin anti-inflamatuvar, bağışıklık koruyucu, antioksidan, antiapoptotik ve antimikrobiyal özellikleri ile daha fazla klinik araştırmaya zemin hazırlamaktadır (18).

Arı poleni, sağlık üzerinde birçok faydalı etkiye sahip olup, bunlar arasında antioksidan, antifungal, antimikrobiyal, antiviral, anti-inflamatuvar, bağışıklık sistemi uyarıcı, antitümör ve lokal analjezik etkiler yer almaktadır (19, 20). Arı poleni ekstraktı, nitrik oksit üretimini inhibe ederek inflamatuvar sıvıların hacmini azaltır ve lökosit birikimini engeller. Arı polenin literatürdeki yeri ve anti-inflamatuvar etkilerini destekleyen bulgular incelendiğinde, dünya genelinde yaygın olarak görülen kronik inflamatuvar hastalıklardan biri olan periodontitis tedavisindeki potansiyel rolü oldukça umut verici olarak değerlendirilmektedir.

Tüm bu veriler doğrultusunda çalışmamızın hipotezi; arı polenin periodontal hastalıkta dental plağın primer etyolojik nedeni olduğu inflamasyonu ve alveolar kemik kaybını azaltabileceğidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Periodontal Hastalık

Periodontal hastalıklar oldukça yaygın olup, dünya nüfusunu büyük oranda etkilemektedir. Bu hastalıkların en hafif formu olan gingivitis, diş etlerine bitişik diş yüzeylerinde biriken bakteriyel biyofilm nedeniyle gelişir. Gingivitis, dişlerin destekleyici dokularını etkilemeden tedavi edilebilir ve bu durum genellikle geri dönüşümlüdür. Gingivitis, periodontal hastalığın başlangıç aşamasını ifade eder ve diş etlerinde iltihabi reaksiyon ile karakterizedir. Bu durum, dişlerin etrafındaki destek dokular üzerinde etkili olmaktadır (21). Klinik olarak, gingivitis diş etlerinde kızarıklık, şişlik ve kanama gibi belirtilerle kendini göstermektedir. Gingivitis, uygun ağız hijyeni uygulamaları ve düzenli diş fırçalama ile tedavi edilebilir ve genellikle geri dönüşümlüdür. Bununla birlikte, tedavi edilmediğinde gingivitis ilerleyerek, bağ dokusu ve kemik desteğinin kaybına yol açan ve geri dönüşümsüz hasarlarla sonuçlanabilen periodontitise dönüşebilir (22). Başka bir ifadeyle periodontitis, periodontal hastalığın diş eti iltihabının ötesine geçerek kronik ve geri dönüşü olmayan bir enflamatuvar hastalığa ilerlemesidir. Kronik periodontitis, genetik predispozisyon, dental plak bakterileri ve bağışıklık mekanizmalarının önemli katkıda bulunduğu, dişleri destekleyen dokuların iltihaplanmasıyla karakterize bir hastalıktır. Bu dengenin bozulması, periodontal hastalıkların gelişimine yol açabilecek bir ortam yaratır (23). Periodontitis teşhisi, klinik olarak sondalama ile tespit edilen kanama, periodontal cep derinliği ve klinik ataşman kaybı gibi bulgulara dayanmaktadır (24).

Periodontitis, kronik inflamatuvar bir hastalık olarak, subgingival mikrobiyota ile konak bağışıklık tepkisi arasındaki karmaşık etkileşimler sonucunda ortaya çıkan bakteriyel bir enfeksiyondur. Kronik inflamasyon, vücudun enfeksiyon veya diğer tetikleyicilere sürekli yanıt vermesi sonucunda ortaya çıkan ve doku hasarına yol açan karmaşık bir süreçtir (25). Kronik periodontitis, ağız mikrobiyotasındaki dengesizlik (disbiyozis) ile birlikte hem doğuştan hem de edinilmiş bağışıklık sistemine ait hücreler ve mediatörler aracılığıyla ortaya çıkan pro-inflamatuvar olaylarla karakterize edilen bir periodontal hastalıktır (26). İnflamasyonun sürmesiyle birlikte, periodontal dokuların bileşenleri olan gingiva,

periodontal ligament, sement ve alveolar kemik zamanla hasar görür (27). Bu durumda, bakteriyel etmenler dokulara ve çevresindeki periodonsiyuma derin bir şekilde nüfuz edebilir. (28)

Periodontitis, tedavi edilmediğinde iltihabın daha derin dokulara yayılmasına ve dişleri destekleyen kemikte değişikliklere neden olarak diş kaybına yol açabilen bir diş eti hastalığıdır (29). Periodontal hastalık etyolojisinde birden fazla faktör rol alır. Periodontal hastalıkta başlıca etyolojik faktör, diş yüzeylerinde biriken bakteri kaynaklı biyofilmdir (30). Hastalığın ilerlemesinde konak yanıtının yanı sıra, plak ve diş taşı gibi lokal faktörlerin etkisi vardır. Bunun yanı sıra, genetik faktörler, çevresel etmenler, bireyin genel sağlık durumu, alışkanlıkları ve sosyal koşullar da hastalığın gelişiminde etkili olmaktadır (31). Periodontitis, periodontal dokularda meydana gelen kronik inflamasyonu tetikleyen düzensiz inflamatuvar etkileşimlerle karakterizedir; bu etkileşimler hem doğuştan hem de kazanılmış bağışıklık yanıtlarını içermektedir (32). Periodontal epitel, dış ortam ile alttaki bağ dokusu arasında bir arayüz oluşturur ve diğer mukozal yüzeylerle benzer özellikler taşır. Kronik periodontitisin temel tetikleyicisi, yıkıcı inflamasyon potansiyeline sahip disbiyotik mikrobiyaya varlığı olarak belirlenmiştir. Bunun yanı sıra, kimyasal veya mekanik çevresel stres faktörleri, oral inflamasyonu tetikleyebilecek veya teşvik edebilecek etkiler taşımaktadır (2). Konak genetik özellikleri, epitelyal bariyer aracılığıyla, hastalığa yatkınlık ya da korunma sağlama kapasitesine sahip olabilir. Ayrıca, sistemik sağlık durumu ve çevresel faktörler de kronik periodontitisin gelişimiyle ilişkilidir. Çevresel etmenler ve konak tarafından başlatılan proinflamatuvar reaksiyonlar, periodontal dokularda sürekli bir inflamasyon sürecine yol açarak, doku hasarına ve nihayetinde kemik ile diş kaybına neden olmaktadır (33). Periodontopatojenlerin zararlı etkileri yalnızca diş eti ile sınırlı kalmayıp; aynı zamanda hastaların sistemik sağlık durumunu da olumsuz yönde etkilemektedir ve bu durum periodontitis tedavisinin önemini ortaya koymaktadır (34).

Periodontitisin teşhisi, kapsamlı bir periodontal değerlendirme gerektirmektedir. Bu değerlendirme; çeşitli klinik parametreleri içerir. Biyofilm indeksi, sondlama derinliği, sondlamada kanama varlığı, mukogingival deformite, furkasyon tutulumu, diş hareketliliği bu parametrelere örnektir. Radyografik

değerlendirme de, horizontal ve dikey alveolar kemik kaybını değerlendirmek amacıyla yapılmalıdır (35).

Başlangıç periodontal tedavi, primer etyolojik ajan olan plağın ve plak bakteri ajanlarının uzaklaştırılmasını içermektedir. Periodontal hastalığın cerrahi olmayan başlangıç tedavisinde, hem supragingival hem de subgingival diş plağının ve diş taşlarının profesyonel temizlik ve kök yüzeyi düzleştirilmesi ile uzaklaştırılması gerekmektedir. Bununla birlikte, hastada mevcut risk faktörlerinin değerlendirilmesi ve yönetilmesi, periodontal tedavinin önemli bir bileşenini oluşturmaktadır. Cerrahi olmayan periodontal tedavinin temel amacı, inflamasyonu kontrol altına almak, hastalığın ilerlemesini durdurmak ve hastanın uzun vadede sağlıklı ve fonksiyonel bir yaşam sürmesine olanak tanıyacak koşulları oluşturmaktır (36). Cerrahi olmayan periodontal tedavi, yardımcı tedavilerle birlikte veya tek başına periodontitis için etkili bir yöntemdir. Ancak bu tedavi yaklaşımının bazı sınırlamaları mevcuttur. Genel olarak, derinliği 1–5 mm arasında değişen nispeten sığ sondlama derinliğine sahip bölgeler için, gerektiğinde tekrarlanan kök yüzey düzleştirme, düzenli periodontal bakım tedavileri ve hastanın fırçalama alışkanlıklarının sürekli olarak güçlendirilmesi gibi cerrahi olmayan yaklaşımlar bir tedavi seçeneği olarak değerlendirilebilir. Subgingival diş taşı temizleme etkinliği, sondalama derinliği arttıkça azalır; bu nedenle, sürekli derin periodontal sondalama derinliklerine (6 mm veya daha derin) sahip alanlarda cerrahi periodontal tedavi endikasyonu vardır (37, 38).

Başlangıç periodontal tedavinin yetersiz kaldığı ya da bu tedaviye yanıt vermeyen durumlarda; açık flep debridmanı, cep eliminasyon cerrahisi veya rejeneratif periodontal prosedürler gibi periodontal cerrahi yöntemler gerekliliği oluşabilmektedir (39). Rezektif periodontal cerrahi prosedüründe, kemik içi defektlerin ya da dikey yönlü kemik defektlerinin, osteotomi ve osteoplasti uygulamalarıyla düzeltilmesi veya ortadan kaldırılması gerekir (40, 41). Ardından, diş eti dokusu alveolar krestin yeni yüksekliğine apikal olarak konumlandırılabilir; bu, derin sondlama derinliklerinin azalmasına veya ortadan kalkmasına katkıda bulunur. Belirgin bir alveolar defekti olmayan sürekli derin sondalama derinliklerine sahip alanlarda ise yumuşak doku rezeksiyonu uygulanabilir (42).

Rejeneratif periodontal cerrahi, hastalık süreci sonucunda kaybedilen periodontal dokuları yeniden oluşturmaya hedefleyen bir tedavi yöntemidir. Bu cerrahinin ana hedefi, diş ve destek dokuların bağlantısını güçlendirmek, kemik kazancı sağlamak ve dişlerin periodonsiyum tarafından desteğini artırmaktır. (43, 44). Kemik içi defektler veya dikey defektleri için periodontal rejeneratif tedavi de dikkate alınmalıdır. Yönlendirilmiş doku rejenarasyonunda farklı tip kemik greftleri ve bariyer membranlar kullanılmaktadır. Farklı yaklaşımlar geliştirilmiş olup, son dönemde periodontal rejenerasyonun sonuçlarını daha da iyileştirmek amacıyla biyolojik modifikatörlerin kemik replasman greftleri ve bariyer membranları ile kombinasyon halinde kullanıldığı yaklaşımlar mevcuttur (45-48). Benzer şekilde, mine matris türevleri, osteoblastlar ve periodontal ligament hücrelerinin çoğalmasını desteklemek için periodontal rejenerasyon tedavilerinde tercih edilen farklı materyallerdir (49). Ayrıca, Nd:YAG lazer ile gerçekleştirilen tedavinin de periodontal rejenerasyonu desteklediği bildirilmiştir (50, 51).

Plak ve diş taşının temizlenmesi, periodontitisin standart tedavi yöntemi olarak görülmektedir. Son yıllarda bu tedavi, başlangıç periodontal tedavi protokolü doğrultusunda kök yüzeyi düzleştirilmesi ve antimikrobiyal ajanların kullanımı gibi farklı yaklaşımlarla birleştirilmiştir. Çoğu hastada ağız hijyeni eğitimi, kök yüzey düzleştirme işlemleri ve düzenli bakımın sürdürülmesi, klinik iyileşme sağlamak için yeterli olabilir ve periodontal hastalık kontrol altına alınabilir. Ancak bazı hastalar için konvansiyonel yöntemlerin yanı sıra daha ileri tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır (52). Periodontal hastalıklar, inatçı bakteriyel plak ile dokulardaki proinflatuar yıkıcı olaylar arasındaki denge ile tanımlanabilir. Kök yüzeyi enstrümantasyonu ile inflammatuar yanıt ve antijenik tehlike azaltılabilir; ancak yalnızca mekanik tedavi ile subgingival bakterilerin tamamen ortadan kaldırılması mümkün değildir. Konak yanıt modülasyonu, konvansiyonel tedavi ile birlikte kullanılarak yıkıcı yanıtları azaltmayı, inflamasyonu gidermeyi ve yara iyileşmesini desteklemeyi amaçlamaktadır (53). Bu yaklaşım, periodontal sağlığın sürekliliği için önemli bir strateji sunmaktadır. Konvansiyonel tedavi yöntemleri ve konak modülatör ajanlarının birlikte kullanımı, günümüzde en etkili tedavi yöntemi olarak kabul görmektedir (53, 54).

Son yıllarda, konak modülasyon yaklaşımları, optimal vücut sağlığı ve dengeli bir immün sistemin sağlanmasında kaliteli beslenmenin rolü önem kazanmaktadır. Mineral ve vitamin açısından zengin bir beslenmenin, bireyin konak yanıtı üzerinde olumlu etkiler yarattığı yönünde görüşler bulunmaktadır (55). Periodontal tedavideki bu güncel yaklaşımları anlamak için, periodontal hastalıklarda primer etyolojik faktör olan mikrobiyal plağı ve plak bakteri ürünlerinin oluşturduğu konak yanıtını kavramak önemlidir.

2.2 Biyofilm ve Mikrobiyal Plak

Biyofilm, çeşitli mikroorganizmaların (bakteriler, mantarlar, protozoalar) oluşturduğu ve yüzeylere tutunarak iletişim kurabildikleri, polisakkaritlerden oluşan bir matrisle çevrili karmaşık bir yapıdır. Başka bir deyişle, biyofilm, mikropların bir araya gelerek ekstopolimerik maddeler, proteinler, polisakkaritler ve nükleik asitlerle çevrili bir matris içinde yerleştiği ve bir yüzeye kalıcı olarak bağlandığı çok hücreli bir yapıdır. (56).

Bakterilerin dış yüzeyine tutunması, biyofilm oluşması için ön koşuldur. Dış yüzeyindeki biyofilm periodontal hastalığın gelişiminde önemli rol alır (1). Dental biyofilmin içinde yer alan mikroorganizmaların sinerjik etkileşim göstermesiyle biyofilm daha organize bir yapıya dönüşür (7, 57). Olgun dış biyofilmleri, 700'den fazla bakteri türünü barındırmaktadır (58). Ağızda yaklaşık 700 bakteri türü bulunmasına karşın, yalnızca belirli periodontal bakteriler, periodontal enfeksiyona yol açabilme kapasitesine sahiptir. Bu patojenler, "kırmızı kompleks" bakterilerdir. *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* ve *Porphyromonas gingivalis* yüksek patojenik özellikleri ile öne çıkar (59). Özellikle *P. gingivalis*, kronik periodontitiste "anahtar patojen" olarak kabul edilmektedir (26) ve hastalığın ilerlemesindeki merkezi rolü öne çıkmaktadır. Araştırmalar, *P. gingivalis* ve *T. forsythia*'nın kronik periodontitis ile güçlü bir ilişkisi olduğunu ortaya koymuştur (60). Ayrıca, *P. gingivalis*'in ağız yoluyla verilmesi, osteoklast ve osteoblast dengesi üzerinde önemli değişiklikler yaratarak kemik yıkımına neden olabilmektedir. (61).

Ağız içindeki bakterilerin yerleşimi, bulunduğu doku türüne, kolonizasyon bölgelerine ve dış etmenlere bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Dış eti

sulkusuyla bitişik diş eti papillası arasındaki interdental bölge, bakterilerin hızla çoğalabileceği uygun bir ortam sunmaktadır (62). Biyofilm, başlangıçta öncü mikroorganizmaların kolonizasyonu ile oluşmaktadır ve bu ilk kolonize olan bakteri türlerini, biyofilm yapısında yer alacak diğer mikroorganizmaları takip etmektedir. Biyofilm yapısında yer alan mikroorganizmalar arasından bu öncü bakteri türlerine Streptococcus, Prevotella, Neisseria, Actinomyces ve Veillonella örnek olarak verilebilir. (58, 62). Biyofilm içerisinde yer alan bakteriler birbirleriyle iletişim halindedir, bu iletişim bakterilerin besinleri işleminde yardımcı olur ve bakterileri daha kararlı bir topluluk haline getirmesiyle konak savunamasından koruyucu etki göstermektedir (63, 64).

Biyofilm bileşenlerine karşı gelişen immünolojik ve inflamatuvar yanıtların, periodontal hastalığın belirti ve semptomlarıyla ilişkili olduğu kabul görmektedir (56). Klinik çalışmalar, ağız hijyeni prosedürlerinin sona ermesinin ardından mikroorganizmaların diş yüzeyleri üzerinde hızla kolonize olduğunu ortaya koymaktadır. Bu durum, birkaç gün içinde gingivitisin mikroskobik ve klinik belirtilerinin belirgin hale gelmesine yol açmaktadır (7). Gingival inflamasyon, ilerleyen dönemde periodontitis gelişimi ve dişler etrafında ataşman kaybı için gerekli bir ön koşul olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle, gingivitisin tedavisi, periodontitisin gelişmesini engellemek ve tekrarını önlemek açısından büyük önem taşımaktadır (65).

2.3 Periodontal Hastalığın Histopatolojisi

Bakteriyel plağın biyofilm formu diş ve epitel yüzeyleri arasında devamlı bir etkileşim kurulmasını sağlamaktadır. Temizlenmiş diş yüzeylerinde 2 ila 4 gün arasında dental plak oluşmaktadır. Dental plak birikiminde önce supragingival plak oluşur ve bunu diş eti seviyesinin altında plak oluşumu takip etmektedir. Birkaç gün içinde, bakteriyel virülans faktörleri, özellikle lipopolisakkaritler, epitel hücrelerinin yüzey reseptörleri ile etkileşimde bulunur. Sağlıklı periodontal dokuda, biyofilmden yayılan bakteriler ve bu yüzey etkileşimleri doku yıkımına sebep olmamakta ve doku bütünlüğünü bozmamaktadır. Doku bütünlüğünün korunmasında konağın lokal savunma mekanizmaları görev almaktadır. Bu mekanizmalara örnek olarak; sağlam bir epitel bariyerin varlığı, diş etinin tükrük

ve diş eti oluğu sıvısı (DOS) ile devamlı bir yıkanma halinde olması, epitelin turn-over özelliği ile bakterilerin epitel yüzeyine tutunmasını engellemesi verilebilir. DOS, periodonsiyumun bakteriyel enfeksiyonlara karşı korunmasında önemli bir savunma mekanizması oluşturmaktadır (57, 66).

Periodontal sağlığın bozulması durumunda, DOS içeriğinde değişiklikler meydana gelmekte ve akut enflamasyon parametrelerinde bir artış gözlemlenmektedir (67, 68). Diş eti oluğu sıvısında meydana gelen artış ve vazodilatasyonu takiben vasküler geçirgenliğin artması ile lökositlerin migrasyonunun gözlemlendiği, periodontal hastalık sürecindeki bu aşama 'Başlangıç Lezyonu' olarak adlandırılmaktadır. Başlangıç lezyonunda bağ dokusunda enflamasyon %5 ile %10 arasındadır. Bakteri ve bakteri ürünlerinin daha derine nüfuzu ile enflamasyon bağ dokusuna ilerleyebilmektedir (7). Plak birikiminden 4-7 gün sonra periodontal hastalıkta 'erken lezyon' aşaması başlamaktadır. Erken lezyon, yaklaşık bir haftalık plak birikiminin ardından ortaya çıkar ve gingivitisin ilk klinik belirtileriyle bağlantılıdır. Diş etinde kapillerin proliferasyonu, mikrovasküler yatakların açılması ve süregelen vazodilatasyonun bir sonucu olarak eritematöz görünüm kazanmaktadır (69). Artan vasküler permeabilite, gingival sulkuler sıvı akışının artmasına neden olur ve transmigrasyon yapan nötrofillerin sayısı belirgin bir şekilde artar. İnfiltrasyon yapan başlıca hücre türleri nötrofiller ve lenfositlerdir; özellikle timus kökenli lenfositler (T hücreleri) öne çıkar. Nötrofiller, dokular aracılığıyla sulkusa göç ederek bakterileri fagosit eder (70).

Fibroblastlar genellikle apoptoz yoluyla dejenerasyona uğrar ve infiltrasyon gerçekleştiren lökositler için daha fazla alan sağlar. Kolajen yıkımı, birleşim epiteli ve sulküler epitelin apikal ve lateral bölgelerinde kolajen miktarının azalmasına yol açar. Kollajen hasarı yaklaşık %70 oranında görülmektedir (7). Bu epitel yapılarının bazal hücreleri, bakterilere ve onların ürünlerine karşı sağlam bir bariyer oluşturmak amacıyla proliferasyona geçer; epitel, kolajen azalması gösteren bağ dokusu alanlarına doğru yayılır (71). Enflamasyondan etkilenmiş diş eti bağ dokusu alanı yaklaşık %15 olarak görülmektedir (7). Bu aşamada, gingival dokudaki ödem nedeniyle gingival sulkusta derinlik artışı meydana gelir ve diş etinde klinik olarak ödem ve eritem gözükmemektedir. Ekolojik nişten yardım alarak

subgingival biyofilm apikal yönde çoğalır ve bu durum plak kontrolünün zorlaşmasına sebep olur. Erken gingival lezyon, çevresel etmenlerin etkisiyle uzun süre devam edebilir veya ilerleyici seyredebilir (70, 71). Erken lezyonun ilerlemesi halinde, plak birikimini takip eden iki üç hafta içerisinde erken lezyon ‘yerleşmiş lezyon’ aşamasına dönüşmektedir.

Yerleşmiş lezyon genel bir bakışla, klinik literatürde "kronik gingivitis" olarak adlandırılan hastalıktır. Erken lezyondan yerleşik lezyona geçiş, plak zorluğu (biyofilmin bileşimi ve miktarı), konağın duyarlılığı ve hem lokal hem de sistemik risk faktörleri gibi çeşitli etkenlere bağlı olarak meydana gelmektedir. Page ve Schroeder'in ilk çalışmasında, yerleşmiş lezyonun özellikle plazma hücreleri tarafından domine edilmektedir ve iltihabi hücre infiltrasyonu bağ dokuda önemli bir hacim kaplamaktadır (72). Hücre infiltrasyonu, özellikle birleşim epitel ve sulkuler epitelin çevresinde, kan damarları ve kollajen lifleri arasında yoğun olarak görülmektedir. Nötrofillerin dokuda birikmesini takiben fagosite edilmeyen bakterileri yok etmek amacıyla ekstrasellüler ortama salınan lizozomal içerikler doku yıkımına sebep olmaktadır. Nötrofiller, aynı zamanda matriks metalloproteinaz enzimlerinin (MMP-8, MMP-9) ana üreticisi olarak görev yapmaktadır. Yerleşmiş lezyon aşamasında birleşim epitel ve sulkuler epitel tarafından dış yüzeyine atake olmayan, geçirgenliği fazla, yoğun nötrofil içeren bir cep epitel oluşur. Cep epitelinde ülser alanlar görülebilir. Sondlamada kanama ve sondlama derinliğinde artış ile klinik olarak kronik gingivitis tablosu oluşmaktadır. Yerleşmiş lezyon aşamasında, konağın antimikrobiyal savunma sistemi devreye girerek mikroorganizmalara karşı savaşmaktadır. Antimikrobiyal savunma sistemleri; tükrükte bulunan antimikrobiyal peptitler, nötrofil ve epitel hücreleri (57, 73), ‘patern recognition receptor’ (PRR) olarak örneklendirilebilir (57). PRR, mikroorganizmalar üzerindeki ‘pathogen associated molecular pattern’ (PAMP) ile etkileşime girerek bu bölgeyi tanıdığı anda, sitokinler ve kemokinlerin sentezi gerçekleşir (74). Etkili bir plak kontrolünü takiben yerleşmiş lezyon tamamen geri dönebilmektedir.

Birleşim epitelinin cep epiteline dönüşmeye başladığı ve alveoler kemik yıkımının görüldüğü aşama ‘ilerlemiş lezyon’ olarak adlandırılmaktadır (7). Page ve Schroeder tarafından tanımlanan ilerlemiş lezyon aşamasında; histolojik

incelemede kollajen yıkımı periodontal ligament ve alveolar kemiğe doğru ilerlemektedir (72). Birleşim epiteli apikal yönde ilerler, cep derinliği artar, bakteriler apikal yönde çoğalarak kronikleşen bir inflamasyon cevabına sebep olurlar. İlerlemiş lezyon aşamasında alveolar kemik kaybı görülmektedir (7).

2.3.1 Periodontitis ve Konak Yanıtı

Periodontal dokularda subgingival biyofilmin uzun süreli varlığına yanıt olarak gelişen inflamasyon ve bağışıklık süreçleri vücudun kendini mikroorganizmalara karşı korumasını sağlarken diğer yandan konak kaynaklı inflamasyon mediatörleri doku hasarına sebep olmaktadır. Bu durum periodontal hastalığın klinik semptomlarının oluşmasıyla bağlantılıdır (9). Konak yanıtının doku hasarını tetiklemesinde, başlatıcı faktör olarak subgingival biyofilm rol almaktadır (12). Periodontitis, subgingival plakta bulunan disbiyotik mikrobiyota tarafından tetiklenen karmaşık bir inflamatuvar hastalıktır ve bakteriyel birikim, güçlü bir lokal inflamatuvar yanıtı başlatabilir (75). Lokal inflamatuvar yanıt, pro-inflamatuvar sitokinlerin ve matris metalloproteinazların üretimini içermektedir. İnflamatuvar mediatörlerin ve yıkıcı enzimlerin salınımı periodonsiyumda hasar ve alveoler kemiğin yıkımı ile sonuçlanmaktadır (76). Periodontal hastalık, pro-inflamatuvar sitokinlerin (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 ve TNF- α) ve metalloproteinazların üretiminin artması veya anti-inflamatuvar sitokinlerin (IL-10, TGF- β) ve metalloproteinaz inhibitörlerinin salınımının azalması aracılığıyla ilerlemektedir (77).

2.3.1.1 SİTOKİNLER

Bir çözünür protein grubu olan sitokinler, periodontal hastalıkla anahtar enflamatuvar mediatör olarak rol almaktadır (78, 79). Sitokinler hücreler arası sinyal iletiminde görev alırlar. Sitokinlerin sinyal iletim mekanizması; hedef hücredeki spesifik reseptöre bağlanmasını takiben hücre içi sinyal kaskadının devreye girmesi işe gerçekleşmektedir. Sinyal kaskadı; gen regülasyonuna ve bu regülasyon aracılığıyla fenotipik değişikliklere sebep olmaktadır. Sitokinler geçici olarak

üretilip öncelikle üretildikleri dokuda lokal etkilere sebep olmaktadır (80). Sitokinlerin etki göstermesi için çok düşük konsantrasyonlar yeterli olmaktadır (78). Sitokinler çoklu biyolojik aktivitelere sahiptir. Sitokinler üretildikleri hücre ya da yakındaki hücre reseptörlerini etkileyerek başka bir ifadeyle otokrin ve parakrin etki gösterebilmektedir (9). Sitokinler hem periodonsiyumda yerleşik olan epitel ve bağ doku hücreleri tarafından hem de periodontal hastalık ile birlikte bağ dokuya infiltre olan inflamasyon hücreleri tarafından üretilmektedir. Bu inflamasyon hücrelerine örnek olarak makrofaj, lenfosit ve nötrofil hücreleri verilebilir.

Sitokinler esas olarak bağışıklık yanıtını düzenlemek için üretiliyor olsa da uzun süreli ve yüksek miktarda üretildiğinde doku hasarına sebep olmaktadır (79). Sitokinler matriks metalloproteinaz enzimlerinin üretimi için fibroblast ve osteoklast hücrelerini indüklemekte ve bu proteolitik enzimler doku hasarında rol oynamaktadır (9, 79). Periodontitisin inflamatuvar kaskadında bilinen sitokinlerden IL-1 ve TNF, inflamatuvar yanıtı artıran prostaglandinler gibi diğer medyatörlerin salınımını tetiklerken, litik enzimlerin üretimi ve kemokin sentezini de uyarır (81). Periodontal doku yıkımında önemli bir rol oynayan üç pro-inflamatuvar sitokin, Interlökin-1, IL-6 ve TNF- α olarak öne çıkmaktadır (82). Bu sitokinler, monositler, makrofajlar, dendritik hücreler, epitel hücreleri, keratinositler ve fibroblastlar gibi farklı hücre tipleri tarafından üretilmektedir.

IL-1 α , hücre içindeki süreçlerin düzenlenmesinde rol oynar ve dokuda lokal inflamasyonda etkili olur. IL-1 β ise hücrelerden salınan bir eksternal proteindir (83). IL-1, periodonsiyumda keratinosit, fibroblast ve endotel hücrelerinin proliferasyonunu teşvik etmektedir. Bunun yanı sıra, fibroblastların tip I prokollajen, kolajenaz, hiyaluronat, fibronektin ve prostaglandin E2 sentezini artırarak önemli bir rol oynar. IL-1, periodontal dokuların dengede tutulmasında kritik bir rol oynar; ancak aşırı üretimi, doku hasarına neden olabilir. (84). IL-1 β , matris metalloproteinazlarının üretimini artırarak doku metalloproteinaz inhibitörlerinin üretimini ise azaltmaktadır (85). Ayrıca, kemik yıkımını tetikleyen güçlü bir uyarıcı olarak tanımlanmaktadır (86). Prostaglandin E2 (PGE2) ve IL-1 β , periodontal inflamasyon ve kemik kaybı süreçlerinde önemli bir etkiye sahiptir. Kronik periodontitis hastalarında, gingival dokudaki PGE2 ve IL-1 β gibi pro-

inflamatuvar sitokinlerin seviyeleri, periodontal hastalığın şiddeti ile orantılı olarak artış göstermektedir. PGE₂, periodontitisin önemli mediatörleri arasında yer alır. Lenfosit üretimini baskılayanın yanı sıra, fibroblastlar aracılığıyla kolajen sentezini azaltır ve osteoklastik kemik yıkımını etkilemektedir. (87).

Bakteriyel lipopolisakkarit (LPS) veya IL-1 β ve TNF- α gibi diğer sitokinlerin neden olduğu hücresel aktivasyon aracılığıyla, IL-6 dokuda lokal olarak sentezlenmektedir (88). Ayrıca, periodontitiste, periodontal dokularda da IL-6'nın lokal üretimi tespit edilmiştir (89) ve periodontal cep derinliği ile diş eti oluşu sıvısındaki IL-6 içeriği arasında anlamlı korelasyonlar bulunmuştur (90). Bununla birlikte, kemikiçi ceplerle komşu olan gingival bağ dokusunda IL-6 seviyelerinin yüksek olması, cerrahi olmayan periodontal tedaviye zayıf yanıt gösteren durumlarla ilişkilendirilmiştir (91). İmmun sistemi düzenleyeciyi rolü olan bir diğer pro-inflamatuvar sitokin ise TNF'dir. TNF, kemokinler veya siklooksijenaz ürünleri gibi ikincil mediatörlerin üretimini tetiklemektedir. Bu ikincil mediatörlerin üretimi, inflamasyonun şiddetinin artmasıyla ilişkilendirilir (92). TNF iki farklı formda bulunur; bunlar TNF- α ve TNF- β olarak bilinir. IL-1 ve TNF salınımı benzer hücreler tarafından gerçekleşmektedir (93). IL-1 ve TNF sıklıkla birlikte etkili olarak, inflamatuvar kemik yıkımı gibi bazı ortak patolojik süreçlere yol açmaktadır (94).

Sitokinler izole bir etkinin aksine, pro-inflamatuvar ve anti-inflamatuvar etkileri bir arada bulunduran karmaşık bir sürece neden olmaktadır (79, 81). İnflamatuvar sitokinler, inflamatuvar yanıt sürecinde indüklenen ve bu sürecin başlangıcı ve/veya ilerlemesi ile yakından ilişkili olan sitokinlerdir. IL-6, IL-8, TNF- α , IL-1 alfa ve beta tipleri, pro-inflamatuvar sitokinler arasında yer alır (84). Bu sitokinler, fagositlerin bakterileri yok etme yeteneğini güçlendirir, inflamasyon odağına ilave doğal hücreleri çeker, dendritik hücrelerin olgunlaşmasını uyarır ve patojenlere karşı spesifik bağışıklık yanıtının oluşumunu destekler (57). Anti-inflamatuvar sitokinler ise bu süreci engeller veya en azından bu inflamatuvar kaskadı baskılar. IL-4, IL-10, IL-13 ve TGF- β ; IL-1, TNF, IL-8 gibi kemokinlerin ve vasküler adezyon moleküllerinin üretimini inhibe etmektedir (95).

Sitokinler, çeşitli fizyolojik süreçlerde kritik rol oynamaktadır. Ancak, aşırı salındıklarında patolojik durumlara yol açabilirler. Periodontal hastalıklarda, inflammatuar mediyatörler arasındaki denge, pro-inflamatuar etkinin artması yönünde değişir (93). Periodontitiste sitokin yanıtı yalnızca dokuda lokal olarak gerçekleşmez; periodontitis, serumda da pro-inflamatuar belirteçlerin seviyelerinin artmasına yol açmaktadır. Periodontal patojenlerin varlığı, bu patojenleri taşımayan hastalara kıyasla C-reaktif protein (CRP), IL-6 ve fibrinojen gibi sistemik inflamasyon belirteçlerinin önemli ölçüde daha yüksek seviyelerde bulunmasına neden olmaktadır (96, 97). TNF- α , IL-1 α , IL-1 β ve IL-6 gibi sitokinler, kronik periodontal hastalığın tanısında potansiyel biyomarkerler olarak öne çıkmaktadır. Nussbaum ve Shapira (2011), hastalığın şiddetiyle ilişkili olan lökosit toplanmasının, inflammatuar belirteçler ile hastalığın ilerlemesi arasındaki ilişkiyi güçlendirebileceğini ifade etmektedir (98).

Plak bakterilerinin varlığı ve bakteri ürünleri, lokal inflammatuar yanıtı ve doku hasarına sebep olarak periodontal hastalık gelişimine sebep olur. Çalışmalar, IL-6'nın osteoklast farklılaşmasını uyararak kemik rezorbisyonunu arttırdığını ve kemik oluşumunu engelleyerek periodontal hastalığın patogeneğinde önemli bir rol oynadığını ortaya koymaktadır (99, 100). IL-6, düşük konsantrasyonlarda osteoklastların oluşumunu hızlandırırken, yüksek konsantrasyonlarda mevcut olduğunda olgun osteoklastların aktivasyonunu artırmaktadır (100). Ayrıca, IL-6'nın matriks metalloproteinazlarının (MMP) salınımı ve aktivasyonu ile ilişkili olduğunu gösteren bazı araştırmalar bulunmaktadır. Bu inflammatuar yanıt IL-6 serum seviyeleri normalden yüksek olan periodontal hastalarda patolojik ekstraselüler matris (ECM) bozulmasına yol açabilmektedir (99, 101, 102). IL-6, bakteriyel enfeksiyona karşı konak yanıtının düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (103-105). İnflamatuar süreç başladığında, önce nötrofil hücrelerinin infiltrasyonu ardından monositlerin birikimi gerçekleşir. İnflamatuar hücrelerin yoğunlaşmasının ardından, IL-1 β , TNF- α ve interferon- γ (IFN- γ) gibi çeşitli sitokinler üretilir; bunlar arasında IL-6, en belirgin interlökinlerden biri olarak öne çıkmaktadır (106). Periodontal hastalığı olan ve olmayan bireylerde kantitatif IL-6 değerlerinin değerlendirilmesi, bu proinflammatuar sitokinin periodonsiyum ile ilişkili patolojik süreçler arasındaki yakın bağlantısını net bir şekilde ortaya koymaktadır (107).

IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α ve TNF- β gibi proinflatuar sitokinler, klinik periodontitis sonuçları (108) ve periodontitisle ilişkili inflammatuar hastalıkların gelişiminde kritik bir rol oynayan osteoklastogenez ile ilişkilidir (109). Alveolar kemiğin rezorpsiyonu ve osteoklastik süreçlerdeki artış, sondlama da artan kanama, sondlamada ölçülen periodontal cep derinliği ve klinik ataşman kaybı gibi klinik belirteçlerle birlikte IL-6 aracılı mekanizmalar tarafından başlatılmaktadır (100). IL-6, aktif inflammatuar süreçler sırasında belirgin bir artış gösterirken, başarılı tedavi sonrasında hızla azaldığı için yüksek bir teşhis değeri taşımaktadır (102).

Anti-inflamatuar sitokinler ise, pro-inflamatuar sitokinlerin aksine, bu kaskadı baskılayarak periodontal hastalığın ilerlemesine engel oluşturmaya çalışmaktadır. IL-4, IL-10, IL-13 bu sitokinlere örnek verilebilir (95). Pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar olaylar arasındaki denge, hastalığın ilerlemesini belirlemede kritik bir rol oynamaktadır. Bireysel sitokinlerin yalnızca izole bir şekilde etkili olmadığı, aksine farklı işlevsel aktiviteleri bulunan karmaşık aracı ağlarının bir parçası olarak işlev gösterdiği bilinmektedir (110). IL-4, temel olarak T helper 2 (TH2) hücreleri tarafından üretilen bir immün düzenleyici sitokin olarak, osteoklastogenezini inhibe eden bir molekül olarak tanımlanmaktadır. Bu etki, hem inflammatuar yanıtı modüle ederek ve RANKL ifadesini inhibe ederek dolaylı yoldan, hem de doğrudan prekürsör hücrelerden osteoklastların farklılaşmasını engelleyerek gerçekleşmektedir (111, 112). IL-10 ailesi sitokinleri ise, bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan ve çeşitli etkilere sahip immün baskılayıcı moleküllerdir. IL-10, regülatör T hücreleri (Treg), monositler ve B hücreleri tarafından üretilir ve Th1 ile Th2 hücreleri, monositler ve makrofajlar gibi diğer hücrelerin sitokin üretimini inhibe eder (113). Periodontal hastalık üzerindeki etkileri sınırlı bir şekilde incelenmiş olsa da, hayvan modelleri IL-10'un iltihabi yanıtı down-regüle ettiğini göstermektedir (110, 113).

2.3.1.2 PROSTOGLANDİNLER

Araşidonik asit hücre membranında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinden biridir ve araşidonik asitin oksijenli metabolitleri eikozanoidlerdir. Eikozanoidler temel fizyolojik reaksiyonlarda rol almaktadır (114). Araşidonik asitten eikozanoidlerin sentezinde siklooksijenaz (COX), lipooksijenaz (LOX) ve sitokrom p450 yolları rol almaktadır (115). COX yolu ile ARA ve diğer yağ asitlerinden prostoglandinler üretilmektedir. (116). Prostoglandinler, uzun zincirli doymamış bir yağ asidi olan araşidonik asitten COX-2 yolağı ile üretilen lipid türevi moleküllerdir (117).

COX-2 enzimi sentezinin artışı, proinflatuvar süreçlerin tetikleyicisi olan nükleer faktör kappa β (NF- $\kappa\beta$) aktivasyonu ile başlar. Bu durum, iltihabi yanıtı artıran temel mekanizmalardan biridir (118). COX-2 enzimi, IL-1 β , TNF- α ve LPS gibi maddelerle tetiklendiğinde, PGE2 üretimini artırır ve bu da iltihaplı dokularda PGE2 seviyelerinin yükselmesine neden olur. Prostaglandinler, özellikle PGE2, inflamasyon sürecinde kritik rol oynayan maddelerdir; PGE2 etkisini; kan damarlarını genişleterek ve sitokin üretimini artırarak göstermektedirler (81). PGE2, birçok biyolojik süreci etkileyen önemli bir mediatördür (119); bu süreçler arasında vazodilatasyon, vasküler geçirgenlik, ödem, ağrı ve ateş yer almaktadır (120). Ayrıca, nötrofil ve monosit kemotaksisi üzerinde immünregülatör etki göstermektedir. Prostaglandinler, neredeyse tüm memeli hücreleri tarafından üretilir ve lokal hormonlar olarak, üretim yerlerinde veya yakınında etki gösterirler (121-123). Hem otokrin hem de parakrin etki gösteren bu moleküller, diğer hormonların yanıtlarını düzenleyerek birçok hücrel süreç üzerinde önemli etkilere sahiptir (119).

Prostaglandinler arasında, PGE2 periodontitisin doku yanıtında etkisi en belirgin olanıdır (124, 125). Bu molekül, bağışıklık hücreleri, fibroblastlar ve diğer periodonsiyum hücreleri tarafından üretilir ve periodontitiste, diş etlerinde geniş biyolojik etkilere sahiptir (125, 126). PGE2, inflamatuvar medyatörleri ve MMP'leri uyarırken, osteoklast oluşumunu da destekler. Osteoklastlar üzerindeki etkisi RANKL aracılığıyla gerçekleşmektedir (127).

2.3.1.3 MATRİKS METALLOPROTEİNAZLAR

MMP'ler, kolajen, jelatin ve elastin gibi dış hücre matris bileşenlerini parçalayan bir grup proteolitik enzimdir. Bu enzimler, nötrofiller, fibroblastlar, epitel hücreleri, osteoblastlar ve osteoklastlar gibi farklı hücre tipleri tarafından sentezlenir. MMP'ler parçaladıkları substrata göre gruplandırılır (128). Örneğin MMP-1 ve MMP-8 kollejenaz grubunda olup kollajeni parçalamaktadır (129). MMP'ler, inaktif bir biçimde salgılanır ve latent enzimin bir bölümünün proteolitik parçalanmasıyla aktif hale gelir. MMP'lerin aktivasyonu proteazlar tarafından gerçekleşir. MMP'ler Zn^{2+} ve Ca^{2+} bağımlı enzimler olarak, ekstraselüler matris (ECM) yeniden şekillendirmesinde önemli işlevler üstlenir. Bu enzimler, kolajen, elastin ve proteoglikanlar gibi ECM bileşenlerini parçalama yetenekleriyle pek çok fizyolojik ve patolojik süreçte, örneğin yaraların iyileşmesi, doku yeniden yapılandırılması gibi olaylarda kritik rol oynar (130). MMP'lerin aktivitesi, anti-inflamatuar özellikleri olan proteinaz inhibitörleri tarafından engellenir (78).

MMP'ler, osteoklastların rezorpsiyon alanına ulaşması açısından büyük öneme sahiptir; özellikle MMP-9 ve MMP-14 bu işlevi üstlenmektedir. MMP'ler; sitokinler ve nükleer faktör- κB ligandı (RANKL) salarak osteoklastların bölgeye çekilmesi ve osteoklast aktivitesine katkıda bulunur (131). MMP-2, MMP-9, MMP-13 ve MMP-14 gibi MMP'ler osteoblastik kemik oluşumunda da önemlidir. MMP-14, kemik homeostazına katkıda bulunurken, MMP-14 tarafından aktive edilen TGF- β , osteoblast apoptozunu inhibe eder (132).

Gingival dokularda birçok MMP tanımlanmış olmasına rağmen (örneğin MMP-2, MMP-7 ve MMP-14) (133), diş eti oluşu sıvısında (DOS) en yaygın olarak bulunan MMP'ler MMP-8, MMP-9 ve MMP-13'tür (134, 135). Üç kolajenaz (MMP-1, MMP-8 ve MMP-13) arasında, MMP-8, DOS içerisindeki kolajenaz proteinlerinin %80'ini oluşturmaktadır. Kronik periodontal hastalık durumunda MMP-13 ve MMP-1'in daha düşük konsantrasyonlarda bulunduğunu göstermektedir (136). Özellikle nötrofillere özgü aktif MMP-8 (aMMP-8, kolajenaz-2), gingival ve periodontal ligament kolajeninin parçalanması sonucunda periodontal doku yıkımına yol açan temel hücre kaynaklı kolajenaz olarak kabul edilmektedir (137).

2.3.2 Alveolar Kemik Yıkımı

Kemik rezorpsiyonu, birçok önemli patolojinin anlaşılmasında kritik bir rol oynayan temel bir fizyolojik süreçtir (138). İnflamasyon alveolar kemiğe yaklaştıkça, osteoklastik kemik rezorpsiyonu başlamaktadır (139). Bu süreç, bakteriyel invazyonun önlenmesi açısından koruyucu bir mekanizma olarak işlev görse de, sonunda dişlerde mobilite ve diş kaybı ile sonuçlanmaktadır. Alveolar kemiğin rezorpsiyonu, iltihaplı periodontal dokulardaki periodontal ligamentin bozulması ile eş zamanlı olarak gerçekleşir. Kemik kaybının meydana gelip gelmeyeceğini belirleyen iki temel faktör bulunmaktadır. Birincisi, gingival dokulardaki iltihabi medyatörlerin konsantrasyonu kemik rezorpsiyonunu tetikleyen yolları aktive etmek için yeterli seviyede olmalıdır. Bunun yanında, iltihabi medyatörlerin alveolar kemiğe kritik bir mesafeye kadar nüfuz etmesi gereklidir (93). Histolojik çalışmalar, kemiğin, üzerindeki yaklaşık 0.5 ila 1.0 mm genişliğinde infiltrasyona uğramamış bağ dokusu tabakasının her zaman mevcut olacak şekilde rezorbe olduğunu doğrulamıştır (140). Ayrıca, bakterilerin bulunduğu cep ile kemik arasındaki mesafe en az 2.5 mm olduğunda kemik rezorpsiyonunun durduğu gösterilmiştir (141). Osteoklastlar, proinflatuar sitokinler ve diğer iltihabi medyatörler tarafından uyarılarak kemiği rezorbe ederken, alveolar kemik iltihap cephesinden geri çekilmektedir (142).

Osteoklastlar, hematopoietik kök hücrelerden türetilen, yüksek derecede özelleşmiş, çok çekirdekli kemik rezorpsiyonu gerçekleştiren hücrelerdir (143-145). Osteoklastlar, mineralize kemiğin yıkımından sorumlu oldukları için normal iskelet büyümesi ve gelişimi, kemik bütünlüğünün korunması, kemik remodellingi kalsiyum metabolizması, homeostaz ve onarım gibi vücudun önemli fizyolojik süreçlerinde kritik bir rol oynamaktadır (143, 144, 146). Osteoklastlar, kemik rezorpsiyonunun temel hücreleri olduğundan, alveolar kemik kaybının gerçekleşmesi için bu hücrelerin yerel olarak uyarılması gereklidir (147). Osteoklastik kemik yıkımı; IL-1 β , TNF- α , IL-6 ve PGE2 gibi farklı medyatörler tarafından tetiklenmektedir. (148).

2.3.2.1 OSTEOKLAST ARACILI KEMİK REZORPSİYONUNUN REGÜLASYONU

Kemik yıkım hızı, osteoklastların hematopoietik öncül hücre havuzundan farklılaşması düzeyinde veya olgun hücrenin tutunma, göç ve rezorpsiyon aktivitelerini kontrol eden temel fonksiyonel proteinlerin düzenlenmesi yoluyla regüle edilebilmektedir (146, 149, 150). Hastalık durumlarında fonksiyonel kemik remodelingi için kritik olan homeostatik dengenin bozulması, yıkıcı osteolitik süreçlere yol açmaktadır. İnflamatuvar periodontal hastalıkta, hem mikroorganizmalardan hem de konak yanıtında görev alan mediatörler kemik rezorpsiyonu ve remodelling süreçlerinde rol oynamaktadır (148, 149, 151). Bu kimyasal modülatörler karmaşık işlevlere sahip olup, genellikle birden fazla hücre tipi bu süreçlere dahil olmaktadır. Bazı faktörler osteoklastik hücreler üzerinde doğrudan etkili olurken, diğerleri lokal bölgede farklı hücre tipleri aracılığıyla veya ikincil olarak ek faktörlerin üretilmesi yoluyla dolaylı etkiler göstermektedir (152, 153).

IL-1, IL-6, TNF- α ve TGF- β kemik hücreleri üzerinde etkili sitokinlerdir. Bu özelliklerine ek, sistemik olarak çok farklı etkilere aracılık etmektedirler (154). Osteoblastlar tarafından üretilen sitokinler, çeşitli hormonlar, sitokinler, bakteriler ve LPS tarafından düzenlenmektedir (155). Bu faktörler, lokal etmenlerle sinerjik bir etkileşim aracılığıyla kemik homeostatik dengesini etkileyebilir (144). Dolayısıyla, birçok hormon, büyüme faktörü ve sitokin, osteoklastların farklılaşma, aktivasyon ve fonksiyonlarını düzenleyerek bu hücrelerin aktivitesini regüle etmektedir (154, 156).

Pro-inflamatuvar sitokinler (IL-1, IL-6 ve TNF'ler), periodontal hastalıkta osteoklast aracılı rezorpsiyonun uyarılmasında rol oynamaktadır. İmmünregülatör sitokinlerin (IL-2, IL-4 ve interferon gamma) işlevleri daha az net olmakla birlikte, bu sitokinlerin düşük seviyeleri periodontitiste patolojik sürece katkıda bulunmaktadır (148, 151).

Kemik rezorpsiyonunun regülasyonunda önemli bir diğer nokta lokal mediatörlerdir. Osteoklastların lokal olarak oluşumu ve uyarılması, alveolar kemik kaybı açısından kritik bir öneme sahiptir. IL-1, IL-6, TGF- β , IL-17, TNF- α , TNF-beta, gibi çeşitli mediatörler kemik yıkımını indüklemektedir (76, 147, 151). el

LPS, konak kaynaklı platelet aktivasyon faktörü ve prostaglandinler gibi lipid mediatörlerin de kemik rezorpsiyonu üzerinde etkilidir (149). Makrofajlar ve T lenfositler tarafından üretilen yerel inflamatuvar mediatörlerin kemik rezorpsiyonundaki rolleri incelendiğinde, bu mediatörlerin dokudaki etkileri, osteoblastları uyararak RANKL üretim yollarını doğrudan veya dolaylı olarak etkili olur; dolayısıyla periodontitiste alveolar kemik rezorpsiyonu, hücrel inflamatuvar infiltrat tarafından doğrudan veya dolaylı olarak tetiklenebilmektedir (10, 147, 157).

2.3.2.2 ALVEOLAR KEMİĞİN REZORPSİYONUNDA NÜKLEER FAKTÖR NÜKLEER FAKTÖR- κ B AKTİVATÖRÜ LİGANDININ (RANKL) VE OSTEOPROTEGERİNİN (OPG) ROLÜ

Osteoklastların aktivasyonu ve farklılaşması, TNF ligandı ve reseptörü süper ailesinin üç üyesi tarafından yönlendirilir: osteoklastogenez indüktörü olan RANKL, RANK ve OPG. RANKL (nükleer faktör- κ B aktivatörü ligandı), TNF süper ailesinin bir bileşenidir ve osteoklast farklılaşma faktörü olarak da bilinir (145, 157, 158). RANKL, osteoklastların oluşumunu ve aktivitesini teşvik eden bir sitokin olarak, osteoblastlar ve stromal hücreler tarafından üretilir. Osteoklastların öncü hücreleri üzerinde RANK reseptörleri ile etkileşime girerek kemik rezorpsiyonunu artırır (159). RANKL'nin RANK reseptörü aracılığıyla osteoklast öncülerinin aktivasyonu, bu hücrelerin çok çekirdekli osteoklastlara dönüşümünü sağlayan bir dizi hücre içi olayı başlatmaktadır (160). RANK reseptörü ile ilişkili bu etki, çoğalmayı ve farklılaşmayı teşvik ederek osteoklast oluşumunu desteklemesiyle meydana gelmektedir (145, 150, 161). Buna karşılık, OPG, RANKL'nin etkilerini inhibe eden bir protein olarak işlev görür. Osteoblastlar tarafından üretilen OPG, RANKL ile rekabet eden bir reseptör görevi üstlenerek osteoklastların oluşumunu baskılamaktadır (159).

Osteoprotegerin (OPG), çeşitli hücre tipleri, özellikle osteoblastlar ve kemik iliği stromal hücreleri tarafından üretilen ve dolaşımda bulunan bir tuzak reseptörüdür. OPG, mRANKL'ye bağlanarak osteoklast oluşumunu inhibe eder; bu mekanizma, preosteoklastlarla gerçekleşen uyarıcı hücrel etkileşimi engeller ve RANKL/RANK etkileşimlerini baskılar. RANK, RANKL ve OPG proteinleri

osteoblastlar tarafından yönlendirilen osteoklast hücrelerinin farklılaşmasında kritik öneme sahiptir ve osteoblastlar arasındaki RANKL ile OPG dengesi, yeni osteoklastların çekilmesini yönlendiren önemli bir faktördür (162-164).

Yerleşik periodontal hücreler, özellikle ligament ve diş eti fibroblastları, kemik remodellingi ve rezorpsiyonunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Dokuya infiltre olan lökositler, osteoblastlar, periodontal ligament fibroblastları ve diş eti fibroblastlarını RANKL ve OPG ekspresyonunu etkileyen inflamatuvar mediatörler, örneğin IL-1 ve PGE2 üretir (10, 157, 165, 166).

Kronik periodontal hastalıkta, bakteriyel plağı, diş etleri ve periodonsiyumda yerel bir inflamatuvar yanıt oluşturmaktadır (148). Bu süreç, inflamatuvar hücrelerin artışıyla birlikte PGE2, IL-1 ve RANK-L gibi sitokinlerin salgılanmasına yol açar ve bu da osteoklastlar aracılığıyla kemik rezorpsiyonunu artırır. İnflamatuvar durumlarda, mediatörler aracılığıyla osteoklast aktivitesinin tetiklenmesi kemik yapım ve yıkım süreçleri arasındaki dengenin bozulmasına neden olur. (154, 156, 158). Bu olgu periodontal hastalığın immunopatogenezi olarak adlandırılır ve bu alandaki öncü çalışmalar son on yılda “osteoinmunoloji” adı verilen yeni bir disiplinin ortaya çıkmasına zemin hazırlamıştır (167, 168).

Periodontal hastalık durumunda, diş eti bağ dokusunda T ve B hücreleri, nötrofil ve makrofajların bulunduğu hücresel inflamatuvar infiltratın arttığı ve bu artışın inflamatuvar medyatörlerin salgısında paralel bir artışla ilişkili olduğu görülmektedir (26, 138). Bu inflamatuvar hücreler, osteoblastlar, periodontal ligament ve diş eti fibroblastları gibi stromal hücrelerle etkileşimde bulunur. RANKL aracılığıyla osteoklastogenesis, inflamatuvar kemik rezorpsiyonunda önemli bir rol oynamakta ve periodontitis durumunda RANKL ekspresyonu artmaktadır (145). RANKL aracılığı kemik yıkımı, OPG ile baskılanmaktadır. Diş eti fibroblastları, LPS ve IL-1 salınımına yanıt olarak OPG üreterek osteoklast oluşumunun engellenmesi aracılığıyla koruyucu rol oynayabilir; buna karşın, IL-6 ve IFN üretimi yoluyla kronik inflamatuvar süreçleri artırma potansiyeline de sahiptir. Periodontopatojenik bakterilerin spesifik etkileri aracılığıyla osteoblastların ve periodontal ligament fibroblastlarının RANKL ekspresyonu tetiklenmektedir (10, 11, 144).

RANKL ve OPG'nin üretimi, farklı hücre tipleri tarafından gerçekleştirilen bir süreçtir ve bu süreç; hormonlar, inflamatuvar medyatörler ve bakteri ürünleri gibi hem sistemik hem de lokal uyarılar tarafından kontrol edilir (169). Son dönem araştırmaları, periodontitis durumunda RANKL seviyelerinin artarken OPG seviyelerinin azaldığını ve bunun sonucunda RANKL/OPG oranının yükseldiğini ortaya koymuştur (170). Artan RANKL/OPG oranı, başlangıç periodontal tedavi sonrasında ek yardımcı tedavi yöntemlerinin gerekliliğini ortaya koymaktadır (171).

2.4 Periodontitis Tedavisinde Konak Modülasyonu

Periodontitis, duyarlı bir konak içerisinde disbiyotik bir mikroorganizma topluluğunun varlığıyla ilişkilidir (172). Bakteriler, hastalık patogenezinde önemli bir rol oynamalarına rağmen, hastalar arasında duyarlılık ve tedaviye yanıt açısından farklılıklar gözlemlenmektedir. Sonuç olarak, konak inflamatuvar yanıtı, bakterilere karşı bir tepki olarak periodontal dokuların immün hücreler aracılığıyla bozulmasına yol açmakta ve bu süreç diş kaybıyla sonuçlanmaktadır (173). Mekanik ve cerrahi periodontal tedavi, antimikrobiyallerle birlikte veya olmaksızın, etiyolojik diş biyofilmini mekanik olarak ortadan kaldırarak standart tedavi yöntemleri arasında yer almaktadır; ancak yalnızca mikroorganizmaları hedef almak, tüm periodontal hastalarda istenen olumlu sonuçları sağlayamamaktadır (174). Bu durum, mevcut tedavi yaklaşımlarını tamamlayacak ve konak inflamatuvar yanıtının yıkıcı yönlerini modüle edecek stratejilere olan ihtiyacı vurgulamaktadır.

Modülasyon, bir nesnenin işlevinin veya durumunun bir uyarana ya da değişen kimyasal veya fiziksel bir ortama yanıt olarak değiştirilmesi anlamına gelir. Periodontolojide konak modülasyon tedavisi; doku yıkımını azaltmayı, periodonsiyumun stabilizasyonunu sağlamak veya yeniden oluşturmak için konak yanıtındaki yıkıcı unsurları modifiye etmeyi ve koruyucu ya da yenileyici yanıtları artırmayı amaçlamaktadır. Periodontal hastalığın patogenezinin ilişkin önceki tartışmalarda, başlıca yıkıcı etmenlerin, artmış sondalama derinlikleri, sondlamada kanama, klinik ataçman kaybı ve kanda biyokimyasal belirteçlerin seviyelerindeki

değişiklikler ile sonuçlandığı vurgulanmıştır (175, 176). Günümüzdeki konak modülasyon tedavileri; bu yıkıcı enzimlerin sistemik veya lokal uygulamalarla azaltılmasına yönelik konak yanıtını modüle eden ajanların kullanımı üzerine odaklanmaktadır (175, 177, 178). Özellikle genetik, sistemik veya çevresel faktörler nedeniyle duyarlı bireylerde, kronik (hiper) inflamatuvar yanıtı hedef alan konak modülatör ajanlarının kullanılması, periodontal hastalığın ilerlemesinde olumlu sonuçlar doğurabilir ve geleneksel tedavi yöntemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda ek fayda sağlayabilir (104, 173).

Konak modülasyon tedavisinde kullanılan ajandanlardan biri tetrasiklin, sentetik tetrasiklinler ve kimyasal olarak modifiye tetrasiklinlerdir (CMT'ler). Tetrasilin, geniş etki spektrumuna sahip bir antibiyotik olup, çeşitli sistemik ve periodontal enfeksiyonların tedavisinde kullanılır. Gingival kreviküler sıvı (GCF) içindeki yüksek konsantrasyonu, periodontal ceplerdeki vasküler olmayan bölgelerde patojenlere karşı etkili bir koruma sağlamaktadır. Antibakteriyel özelliklerinin yanı sıra, tetrasilinler MMP aktivitesini inhibe ederek dokudaki kollajen yıkımını engelleyici yani antikollajenaz etki gösterir. Ayrıca, tetrasilinler osteoklast ve osteoblast kaynaklı MMP'leri inhibe ederek alveolar kemik resorpsiyonunu azaltır (52, 179). Tetrasiklin ve onun sentetik türevlerinin kollajenaz enzimlerini azaltma konusundaki etkinliği iyi bir şekilde kanıtlanmış bir tedavi seçeneğidir. Ancak yan etkileri göz önünde bulundurulduğunda, konak modülasyonunda subantimikrobiyal doz doksisisiklin (SDD) uygulaması geliştirilmiştir. SDD'nin periodontal hastalığın tedavisinde mekanik ve cerrahi yaklaşımlara destek olarak etkisi incelendiğinde hastaların plasebo grubuna veya yalnızca diştaşı temizliği ve kök planlaması uygulanan hastalara göre daha iyi klinik iyileşmeler ve serum marker seviyelerinde pozitif sonuçlar bulunmuştur (180-182). Bununla birlikte, bakteriyel ekosisteme karşı antimikrobiyal aktivite, bakteriyel direnç gelişme riski nedeniyle sınırlı bir tedavidir (182).

Konak modülasyon tedavisinde etkili bir diğer ilaç grubu NSAID ilaçlardır. Diş eti oluğu sıvısında yüksek PGE2 seviyeleri ve diğer amino asit metabolitleri periodontal doku hasar ile ilişkilendirilmiştir (181). Bu durum, son yıllarda AA metabolitlerinin azaltılmasına yönelik çalışmaların yoğunlaşmasına neden olmuştur. NSAID'ler, COX ve LOX enzimlerini inhibe ederek, bu yollardan

prostaglandinler, prostasiklinler, tromboksanlar, lökotrienler ve diğer mediatörlerin üretimini engellemektedir. Prostaglandin sentezinin azalması, deneysel çalışmalarla kemik rezorpsiyonunun azalması ile ilişkilendirilmiştir (183-187). Ancak, istenmeyen etkilerin riski, hem seçici olmayan nonsteroidal anti-inflamatuar ilaçların hem de seçici siklooksijenaz-2 inhibitörlerinin kullanılmasını engellemektedir. Bifosfonatlar ise, kemik dokusunda kalsiyum fosfata yüksek afinitesi olan pirofosfat analoglarıdır (188). Bu bileşikler, osteoklastların aktivitesini inhibe etmenin yanı sıra, MMP enzim aktivitesini inhibe ederler. Bifosfonatlar, kemik yoğunluğunun kaybını önlemekte ve normal kemik döngüsünü durdurmaktadır (189). Periodontitis tedavisinde bifosfonatların, diştaşı temizliği ile birlikte kullanımını değerlendiren sınırlı sayıda klinik çalışma mevcuttur. Bu çalışmalar, klinik ve radyografik değerlendirmeler sonucunda kemik seviyelerinde önemli ve ölçülü iyileşmeler göstermiştir (190, 191).

Konak modülasyonunda bir diğer seçenek sitokin modülasyonudur. Periodontal hastalığın patogeneğinde daha önce vurgulandığı üzere, konak hücrelerinden üretilen pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar sitokinlerin düzeyi, bağ dokusu ve alveolar kemik yıkımının derecesini belirlemektedir. İmmün modülasyon terapisi, proinflamatuar sitokinlerin seviyelerini azaltmayı ve/veya anti-inflamatuar sitokinlerin düzeylerini artırmayı amaçlamaktadır. Anti-inflamatuar sitokinler, özellikle IL-4 ve IL-10, konak hücreleri tarafından üretilen IL-1, TNF- α , nitrik oksit ve diğer yıkıcı moleküllerin salınımını inhibe etmektedir. IL-4 ayrıca, IL-1 reseptör antagonistlerinin sayısını artırarak doku yıkımını azaltma işlevi görmektedir. Deneysel çalışmalarda, IL-4 ve rekombinant IL-11'in uygulanmasının artrit ve periodontal hastalık gibi durumlarda hastalık ilerlemesini azaltma ile ilişkili olduğu gözlemlenmiştir. Ancak, immün modülasyonun uzun dönem etkileri henüz tam olarak anlaşılmamış olup, sistemik etkilerini, güvenliğini ve etkinliğini belirlemek amacıyla daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır (192, 193).

Periodontal hastalık sırasındaki konakçı-patojen etkileşimleri, konakçı yanıtlarını destekleyebilecek diğer farmakolojik mekanizmaların gerekliliğini vurgulamaktadır. Bu amaçla; konak modülasyonuna terapötik ajanlar kullanılarak periodontitise yönelik ek tedavi yöntemleri geliştirilmektedir (52). Bu koşullar

altında, inflamatuvar yanıt üzerinde etkili doğal ürünlerin incelenmesi; kullanılan ajanların çoklu antipatojenik etkileri, antibiyotik direnç geliştirme riski, medikal ürünlerin yıkım ve vücuttan atılmasının yükü, güvenilirliklerinin kesin olmaması, istenmeyen etki ve maliyetleri gibi problemlerin üstesinden gelmek için potansiyel kaynak olması nedeniyle umut verici bir alternatif olmuştur. Bu yaklaşımla, probiyotik ve diyetle ek ajanların kullanılması geleceğe dair sürdürülebilir, doğal ve faydalı bir yaklaşım olabilir. Günümüzde yapılan araştırmalar, probiyotiklerin iltihabi kaskadın rol aldığı hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde etkili profilaktik ve terapötik ajanlar olarak potansiyel taşıdığını göstermektedir. Mikrobiyom modülasyonu ve patojenlerin baskılanmasının yanı sıra, probiyotikler bağışıklık ile ilişkili genlerin ifadesini etkileyebilir, iltihaplanma yollarını (örneğin, NF-kB sinyal iletim yolu) inhibe edebilir, T-regülatör hücrelerinin aktivitelerini artırabilir, konak hücrelerini fizyolojik strese karşı koruyabilir ve epitel bariyer işlevini iyileştirebilir (172, 194). Probiyotikler ile mekanik plak temizliğinin bir arada uygulanması, yüksek dişeti indeksi skorlarına sahip bölgelerde daha belirgin bir iyileşme sağlamaktadır (195). Esansiyel yağ asitleri, vitaminler gibi besin takviyeleri de doğal, tedaviye ek terapötik ajanlara örnek verilebilir (196, 197).

Periodontitis, diş etleri ve çevresindeki dokuların iltihaplanmasıyla karakterize edilen kronik bir hastalıktır ve tedavisi genellikle antibakteriyel ve antiinflamatuvar stratejileri içermektedir. Takviyeler aracılığıyla iltihap kaskadının terapötik modülasyonuna yönelik stratejilere odaklanmaktadır (55). Diyetle beraber kullanılabilecek takviyeler açısından yeni bir yaklaşım olarak, arı ürünlerinin periodontal sağlık üzerindeki olumlu etkileri giderek daha fazla dikkat çekmektedir (198, 199).

2.5 Periodontal Hastalığın Tedavisi ve Apiterapi

Apiterapi, bal arısı *Apis mellifera*'nın ürünlerinin (bal, propolis, polen, arı sütü, arı ekmeği gibi) tedavi veya genel sağlık desteği amacıyla kullanılmasıdır (200). Geleneksel ve tamamlayıcı tıp alanlarında önemli bir yer tutan apiterapi, Latince "apis" (arı) ve "terapi" kelimelerinin bir araya gelmesiyle oluşmuştur. Bu uygulamanın kökenleri 5000 yıl öncesine kadar uzanmakta olup, günümüzde modern sağlık yaklaşımları arasında yeniden ilgi görmektedir. Bitkisel ilaçların

etkinliğine dair artan farkındalık ile sentetik ilaçların çok sayıda yan etkisi, araştırmacıları daha az yan etkiye sahip doğal kaynaklı yeni ilaçlara yönlendirmiştir (201). Bal ürünlerinin kronik iltihap üzerindeki etkinliği konusunda literatürdeki çalışmalar hâlâ sınırlıdır fakat çeşitli bitki özlerinin, antimikrobiyal, analjezik, hemostatik, antibakteriyel, anti-inflamatuar, antifungal ve antiviral etkileri araştırılmıştır (202-204).

Bal arıları, insanlar için potansiyel sağlık faydaları sunan ve bioaktif bileşenler içeren çeşitli maddeler üretmektedir; bunlar arasında bal, kraliçe jeli, propolis, arı zehiri, polen ve arı balmumu bulunmaktadır. Balın başlıca bioaktif bileşenleri arasında fenolik bileşenler, metilglioxal, kraliçe jeli proteinleri ve oligosakaritler yer almaktadır. Bal proteinlerinin immünomodülatör etkileri üzerine yapılan çalışmalar, MRJP-3'ün antijenle uyarılmış T hücrelerinde IL-2, IL-4 ve IFN- γ üretimini inhibe ettiğini göstermiştir (205). Kraliçe jelinde bulunan antimikrobiyal peptidler antimikrobiyal, anti-inflamatuar, immünomodülatör, nöromodülatör, metabolik sendromu önleyici ve yaşlanma karşıtı etkinlikler sergilemektedir. Propoliste, Brezilya propolisine özgü kafeik asit fenetil ester ve artepillin C bulunmakta olup, bu bileşenlerin antiviral, immünomodülatör, anti-inflamatuar ve antikanser etkileri olduğu tespit edilmiştir. (200).

Propolis, bal arılarının bitkilerden topladığı reçineli bir maddedir ve kovan yapımında kullanılır (206). Propolisin tanenler, flavonoidler ve uçucu yağlar gibi bileşenleri, farmakolojik özellikler ile ilişkilendirilmiştir (196, 202). Bu bileşenlerin bakteriyel hücre duvarları ve lipopolisakkarit gibi bileşenler üzerinde etkili olduğu ve ağız içi biyofilmindeki protein miktarını azalttığı belirtilmektedir. Propolis özleri, *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium sp.*, *Capnocytophaga sp.* ve *Eikenella sp.* gibi mikroorganizmaların büyümesini ve yapışmasını engellemede başarılı olmuştur (207, 208). Bunun yanı sıra, propolisin anti-inflamatuar etkileri ile antipsoriatik ve analjezik özellikleri de bulunmaktadır. Bu nedenle, propolisin periodontal hastalıklarda inflamasyonu ve alveolar kemik kaybını azaltmada önemli bir rol oynayabileceği düşünülmektedir (209).

Kronik inflamasyon üzerindeki arı ürünlerinin etkinliği hakkında yapılan bir çalışmada bal, propolis, polen, kraliçe jeli ve arı ekmeğinin anti-inflamatuar aktiviteleri incelenmiş ve karşılaştırılmıştır. Bal, propolis, polen, arı ekmeğinin anti-inflamatuar etkileri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş ve pro-inflamatuar sitokin seviyelerini belirgin şekilde azalttığı tespit edilmiştir ($p < 0.001$). Anti-inflamatuar sitokinler arasında, polen, arı ekmeği ve propolisin IL-4, IL-10 ve IL-1RA seviyelerini en fazla artırdığı gözlemlenmiştir. Pro-inflamatuar sitokinler açısından, polen, arı ekmeği ve propolisin IL-6 ve TNF- α seviyelerini en çok düşürdüğü; polen, arı ekmeği ve balın IL-1 β seviyelerini en belirgin şekilde azalttığı bulunmuştur. Tüm arı ürünlerinin önemli anti-inflamatuar aktiviteleri olduğu sonucuna varılmıştır. En yüksek antiinflammatuar aktivite polen uygulaması ile, ardından arı ekmeği ve propolis ile gözlemlenmiştir (210). Bu çalışmada daha önce periodontal hastalıkta etkisi kanıtlanmış olan propolise oranla, daha fazla antiinflammatuar etki gösteren arı polenin periodontitis tedavisinde potansiyel rolü olabileceği düşünülmüştür.

2.6 Periodontitis Tedavisinde Potansiyel Terapötik Ajan: Arı Poleni

Arılar, dünya genelinde geniş bir biyoçeşitliliğe sahip olup, bitki çeşitliliğinin korunmasında temel bir rol oynar ve birçok bitki türünün polinasyonundan sorumludurlar. Arı ürünleri, tanınmış terapötik ve besin özellikleri sayesinde nesiller boyu insan sağlığında yaygın olarak kullanılmaktadır (211). Arı poleni, çiçek poleni, nektar, enzimler ve diğer arı sekresyonlarının karmaşık bir karışımını içerir (212). Arı poleni, vitaminler, mineraller, steroller, esansiyel yağlar, amino asitler, hormonlar, enzimler ve doğal antibiyotikler gibi yüksek kaliteli besinler açısından zengin olduğu için ticari olarak büyük ilgi görmektedir. Ayrıca, karotenoidler, flavonoidler, polifenoller ve diğer sağlıklı bileşikler bakımından da fazladır (212-214). Bu nedenle, arı polenin insan beslenmesinde yer alması, iyi hissetme duygusu sağlayabilir ve vücudun işlevsel dengesine katkıda bulunabilir (215). Arı poleni, antimikrobiyal, antifungal ve antioksidan özellikler taşımakta olup, ateroskleroz, solunum hastalıkları ve prostat hastalıkları gibi çeşitli patolojik durumlara karşı koruyucu etkiler sunmaktadır.

Ayrıca, arı polenin kardiyovasküler sistem, gastrointestinal sistem ve bağışıklık sistemi işlevlerini iyileştirdiği gözlemlenmektedir (216).

Arı poleninde bulunan fitosteroller, karbonhidratlar, enzimler, fenolik bileşenler, flavonoidler, nükleik asitler, triterpenler, vitaminler ve diğer biyolojik olarak aktif maddelerin önemli miktarları, anti-inflamatuar ve antioksidan etkinlik gibi çeşitli aktiviteler sunar (217). Bu durum, arı polenin yeni farmakolojik kaynakların araştırılmasında dikkate değer bir biyolojik potansiyele sahip olduğunu göstermektedir (218). Flavonoidler, bitkilerin ikincil metabolitleri arasında yer alan, çeşitli yapılar ve düşük moleküler ağırlığa sahip bileşiklerdir. Fotosentez yapan hücrelerde önemli görevler üstlenirler ve biyoaktif polifenollerdir (219, 220). Arı polenindeki fenolik bileşiklerin çoğunlukla karbonhidratlarla birleşerek glikozit formunda yer aldığı ve bu bileşiklerin, polenin biyoaktif özelliklerinin yanı sıra tane rengini (sarı, kahverengi, mor ve kırmızı) ve kendine özgü acı tadını etkilediği bildirilmiştir (221). Arı poleninde yüksek miktarda bulunan flavonoidler ve fenolik bileşenler, inflammatuar parametrelerden lökosit birikimi, granülasyon dokusu ağırlığı, inflammatuar eksudalar ve anjiyogenezin azalmasında etkili olmaktadır. Gözlemlenen bu etkilerin, ekstraktın VEGF ve TNF- α konsantrasyonları üzerindeki inhibe edici etkisiyle ilişkilendirilebileceği öne sürülmektedir (17).

Flavonoid bileşenlerin immünomodülatör özelliklerinin temelini, proinflammatuar sitokinlerin ve reseptörlerinin üretimini inhibe etme yetenekleri oluşturmaktadır (222, 223). Ayrıca, alerjik ve inflammatuar yanıtlarla ilişkili çeşitli enzim sistemlerini etkilerler, Bu enzimlere; tirozin ve serin-treonin protein kinazları, fosfolipaz A2, fosfolipaz C ve lipoksijenaz enzimleri örnek verilebilir (224). Bu biyolojik etkilerin büyük bir kısmı, flavonoidlerin redükte etme kapasitelerine dayanır. Bunun yanı sıra, endojen savunma sistemlerini aktive ederek ve çeşitli fizyolojik süreçleri modüle ederek dolaylı bir koruma sağlayabilirler (225). Arı poleni bu faydalı etkileri dolayısıyla insan beslenmesinde gıda takviyesi olarak kullanılmaktadır (226).

İnflamasyon, fiziksel veya biyolojik etkenlerin neden olduğu doku veya hücre hasarına karşı bir fizyolojik yanıttır. İnflamasyon, alerjiler, artrit, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, periodontal hastalıklar gibi birçok hastalıkla doğrudan

ilişkilidir. Arı poleni, yüksek anti-inflamatuar aktivitesi ile karakterizedir. Fenolik ve flavonoid bileşenlerin içerikleri ile arı polenin anti-inflamatuar aktivitesi arasında önemli bir pozitif korelasyon bulunmuştur (42, 227). Bir deneysel çalışma, Cistus arı polenin etanolik ekstraktının, karrageenan ile indüklenen ödem üzerinde belirgin bir inhibe edici etkiye sahip olduğunu ortaya koymuştur. Bu ekstrakt, nitrik oksit üretimini ve COX-2 aktivitesini azaltmıştır. İltihabi yanıtta COX-2 aktivitesi aracılığıyla PGE2 ve PGI2 gibi prostaglandinlerin üretimi teşvik edilmektedir. Sonuç olarak, Cistus poleninden elde edilen flavonoidlerin, özellikle quercetin, kaempferol ve isorhamnetin, arı polenin bazı anti-inflamatuar etkilerine kısmi katkıda bulunabileceği değerlendirilmiştir (226). Moita ve çalışma arkadaşları, benzer bulgulara in vitro koşullar altında ulaşmışlardır. Araştırmalar, E. plantagineum polenin hidrometanolik ekstraktının, LPS ile uyarılan makrofajlarda nitrik oksit ve prostaglandin salınımını azaltarak anti-inflamatuar etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur. Çalışmalar, arı poleni ekstraktının anti-inflamatuar özelliklerinin, başta quercetin ve kaempferol olmak üzere flavonoid bileşenleriyle ilişkili olduğunu vurgulamaktadır (42). Bu bulgular, arı polenin anti-inflamatuar etkisinin, siklooksijenaz ve nitrik oksit sentazların aktivitesini inhibe etme mekanizması aracılığıyla gerçekleştiğini düşündürmektedir. Söz konusu enzimler, araşidonik asidin prostaglandinlere dönüştürülmesinde ve L-argininden nitrik oksit üretiminde kritik bir rol oynamaktadır. Ayrıca, belirli flavonoidlerin alımı ile iltihabi reaksiyon ile ilişkili hastalıkların riskinde azalma arasında anlamlı bir ilişki bulunmaktadır (228).

Quercetin ve kaempferol, arı polenin öne çıkan flavonolleri olarak (229), antioksidan (230) ve anti-inflamatuar (228, 231) özellikler taşıdığı belgelenmiştir. Quercetin, araşidonik asit metabolizmasında rol oynayan enzimlerin (fosfolipaz A2, siklooksijenaz ve lipoksijenaz) yanı sıra, kronik prostatit gibi bazı hastalıkların patogeneğinde etkili olan IL-8 gibi inflammatuar sitokinlerinin aktivitesini inhibe etmektedir (232). Kaempferolün, inflammatuar hücrelerinin fonksiyonunu ve proinflammatuar sitokinlerin iletilerini inhibe etme yeteneği nedeniyle antiinflammatuar etkiler gösterdiği bildirilmektedir (228).

Arı polenin bir diğer önemli terapötik yanı antioksidan etki göstermesidir. Fenolik bileşiklerin antioksidan etkinliği, kimyasal yapılarına bağlıdır ve bu yapı,

bileşiklerin redüktör olarak işlev görme özellikleriyle belirlenir (230). Flavonoidler, polifenolik bileşikler arasında güçlü antioksidan ve serbest radikal avcılar olarak tanınmaktadır. In vitro çalışmalar, flavonoidlerin antioksidan kapasitesinin E ve C vitaminlerinden daha yüksek olduğunu göstermiştir (233). Flavonoid bileşikleri, in vitro koşullarda lipid peroksidasyonunu, süperoksit anyonları ve hidroksil radikallerini erken aşamalarda avlayarak inhibe eder. Zincir radikal tepkimelerini, peroksi radikaline hidrojen iyonu bağışlayarak sonlandırarak etkili olurlar. Arı poleni, zengin bir flavonoid kaynağıdır ve bu flavonoidler, antioksidan ve serbest radikal avlama özelliklerinde önemli bir rol oynamaktadır (234, 235).

Arı polenin anti-inflamatuar etkisinin yanında antimikrobiyal aktivitesinin de değerlendirildiği bir çalışmada; tüm arı poleni örnekleri önemli derecede antimikrobiyal aktivite göstermiş olup, gram pozitif bakterilerin en duyarlı olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, arı polenin iyi bir antioksidan aktiviteye sahip olduğunu ortaya koymakta ve serbest radikallerin rol oynadığı hastalıkların önlenmesinde yararlı olabileceğini öngörmektedir (216). Oksidatif stres, serbest radikallerin üretimi ile bu radikallere karşı savunma sistemi olan antioksidan sistemler arasındaki dengenin bozulmasıyla ortaya çıkar ve bu olay reaktif oksijen türlerinin birikmesine neden olur. ROS, hücre içerisinde proteinler, membran lipidleri ve DNA gibi çeşitli bileşenlerle etkileşime girer (236). Bu etkileşimler, hücrelerde ciddi hasar oluşturabilir ve diyabet, artrit, Parkinson ve Alzheimer gibi birçok kronik hastalığın patogeneze katkıda bulunabilir (237). Polifenolik bileşikler, özellikle flavonoidler, antioksidan özellikleri sayesinde insan sağlığına faydalı etkiler sunar. Kawai ve ekibi, flavonoid ve polifenolik bileşiklerin bazofiller ve mast hücreleri üzerinde histamin salınımını, IL-4 ve IL-13 üretimi ile CD40 ligandı ifadesini engelleyerek antialerjik etki gösterdiğini belirtmiştir. Arı polenindeki belirli biyomoleküllerin IL-4 sentezini inhibe edebileceğini ortaya koymuştur (165).

Doğal kaynaklardan elde edilen maddeler, örneğin arı poleni özü ve içerisindeki fitokimyasallar, mevcut tedavi yöntemlerinin yan etkilerini azaltarak anti-inflamatuar tedavi olarak umut vaat etmektedir (238). Günümüzde, non-steroidal anti-inflamatuar ilaçlar (NSAID'ler) ve antimikrobiyaller geleneksel tedavi protokollerinde sıkça kullanılmaktadır (239). Ancak ilaçların vücuttan

atılımı ve yan etkiler göz önünde bulundurulduğunda, NSAID'lerin etkilerini taklit eden, antimikrobiyal özelliğe sahip daha az yan etkiye sahip doğal maddelerin araştırılmasına olan ihtiyacı artırmaktadır (240). Araştırmalar, arı poleni ekstraktının antialerjik (241), immünomodülatör (242), antioksidan (243), radikal temizleyici (244), ve anti-inflamatuar (245) özelliklere sahip olduğunu göstermektedir. Bu tıbbi etkiler, belirli flavonoid türleri aracılığıyla kısmen gerçekleşmektedir. Özellikle kuersetin, kampferol, mirisetin ve izorhamnetin gibi flavonoidlerin, arı polenin antialerjik ve anti-inflamatuar etkilerinde önemli bir rol oynadığı saptanmıştır (241, 245). Ayrıca, birçok flavonoidin yapısının yeni ilaçların geliştirilmesinde şablon olarak kullanılabilmesi, yüksek flavonoid içeriğine sahip arı polenlerini gelecekteki farmakolojik, immünolojik ve moleküler araştırmalar için değerli adaylar haline getirmektedir.

Periodontitiste konak modülasyonu, hastalığın gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. Konak modülasyonu, bağışıklık yanıtını düzenleyerek ve iltihabi yanıtı module periodontal dokuların sağlığını koruma potansiyeline sahiptir. İnflamatuar bir hastalık olan periodontal hastalıkta; güncel tedavi yaklaşımı olarak öne çıkan konak modülasyonu tedavisi ele alındığında, doğal anti-inflamatuar etkiye sahip ürünler değer taşımaktadır. Arı polenin inflammatuar hastalıklarda koruyucu rol oynadığı bildirilmiştir. Bu çalışmada, arı poleni takviyesi ile periodontal hastalıkta arı polenin konak cevabını etkileyerek alveoler kemik kaybını ve yıkıcı inflamasyon cevabını azaltılabileceği varsayılmaktadır. Bilgilerimiz dahilinde arı polenin, kronik inflammatuar hastalıklardan biri olan periodontal hastalık gelişimindeki rolü araştırılmamıştır. Tüm bu bilgiler doğrultusunda, bu çalışmanın amacı deneysel periodontitis oluşturulan ratlarda oral gavaj yoluyla arı poleni uygulamasının;

1. Alveoler kemik yıkımına olan etkisinin histopatolojik, histomorfometrik ve immunohistokimyasal olarak incelenmesi,

2. Serum örneklerinde anti-inflamatuar etkiye sahip IL-4 ve pro-inflamatuar etkiye sahip IL-6 sitokinlerinin düzeylerine olan etkisinin incelenmesidir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma için Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Hayvan Araştırmaları Yerel Etik Kurulu'ndan onay alındı. (Karar numarası: 2024/11)

3.1 Deney Hayvanlarının Bakım Koşulları

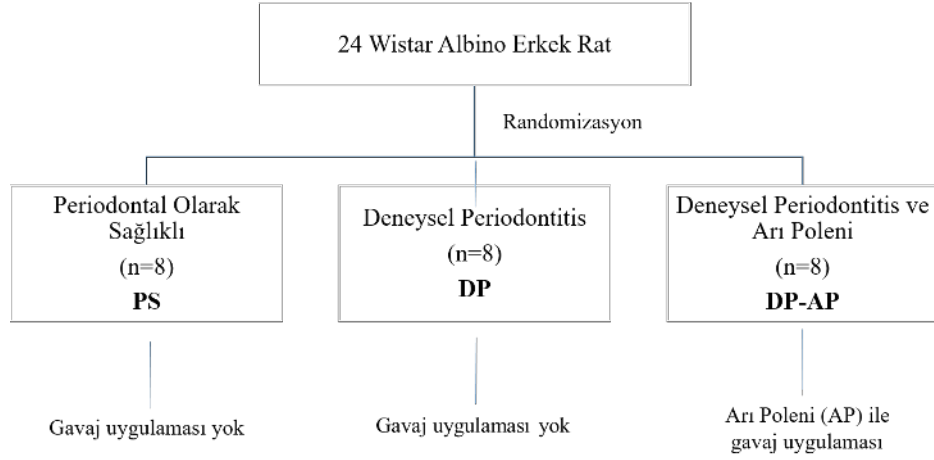
Bu araştırmada kullanılan sıçanlar Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Deney Hayvanları Merkezi'nden temin edildi. Araştırmada 10-12 haftalık, ortalama ağırlıkları 200-300 gram olan 24 adet erkek Albino Wistar sıçan kullanıldı. Erkek rat seçiminin nedeni dişi ratların hormonal sikluslarından kaynaklanan değişimlerin deney sonucunu etkileme riskini ortadan kaldırmaktır. Deney toplam 24 sıçan ile tamamlanarak herhangi bir kayıp yaşanmadı. Tüm hayvanlar AİBÜ Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (DEHAM), 12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde, uygun sabit ısı ($20^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$) ve nispi nemi %60-70 olan ortamda, 3 grup ve grupların herbirinde 8 rat olacak şekilde plastik tabana sahip tel kafeslerde barındırıldı. Deney sürecinde tüm sıçanların adlibitum besin ve su ile beslenmeleri sağlandı.

Deneysel periodontitis modeli oluşturabilmek için tüm sıçanların üst çene ikinci azı dişlerinin servikalleri etrafına aynı gün subgingival olarak 3/0 ipek sütür (Doğsan cerrahi ipek sütür, 20 mm 3/8 keskin 75 cm) ile ligatürleme uygulandı. Arı poleni takviyesi verilen gruba ligatürleme işleminden 24 saat sonra başlanarak takip eden 14 gün boyunca oral gavaj uygulandı. 14. Günün sonunda uygun anestezi protokolü ile sıçanlar kardiyak kan alınması yöntemi ile kurban edildi. Sıçanların üst çeneleri yumuşak dokular diseke edilerek alındı.

3.2 Çalışma Gruplarının Belirlenmesi

Çalışmada yer alan 24 adet sıçan randomize olarak 3 gruba ayrıldı.

1) Periodontal olarak sağlıklı, (PS), 2) Deneysel periodontitis grubu (DP), 3) Deneysel periodontitis + arı poleni (DP-AP). Sonrasında arı poleni uygulaması oral gavaj yoluyla gerçekleştirildi.



Şekil 3-1. Deney Hayvanlarının Randomizasyonu

3.3 Deneyisel Periodontitis Oluşturulması ve Çalışma Protokolü

Deneyisel Periodontitis modeli oluşturmak için sıçanlara 90 mg/kg ketamine, 10 mg/kg xylazine intramusküler olarak uygulandı. Sıçanlar anestezi altına alındıktan sonra anestezi derinliğinin takibi için pupil refleksi, ayak refleksi ve kas tonusu değerlendirildi. Deneyisel periodontitis modelini indüklemek için bu gruplarda, her sıçan için sağ ve sol üst 2. azı dişlerinin servikalleri etrafına 3/0 ipek sütür bir miktar subgingival olacak şekilde yerleştirildi.



Fotoğraf 3-1. Deneyisel Periodontitis Modeli

Süturlar 14 gün boyunca bölgede tutuldu ve her gün uygulaması olmaksızın kontrol edildi. Ligatürlerin bağlanmasını takiben ertesi gün oral gavaj uygulaması yapılacak olan arı poleni grubunda uygulamaya başlandı. Test grubundaki sıçanlara günde bir defa her gün aynı sabah saatlerinde olmak üzere 14 gün boyunca gavaj yoluyla arı poleni verildi. Sıçanlara gavaj uygularken arı polenin lokal etkileri de düşünülerek gavaj enjektörü çekilirken bir miktar da ağız içine arı poleni verildi.



Fotoğraf 3-2. Arı polenin oral gavaj yolu ile verilmesi

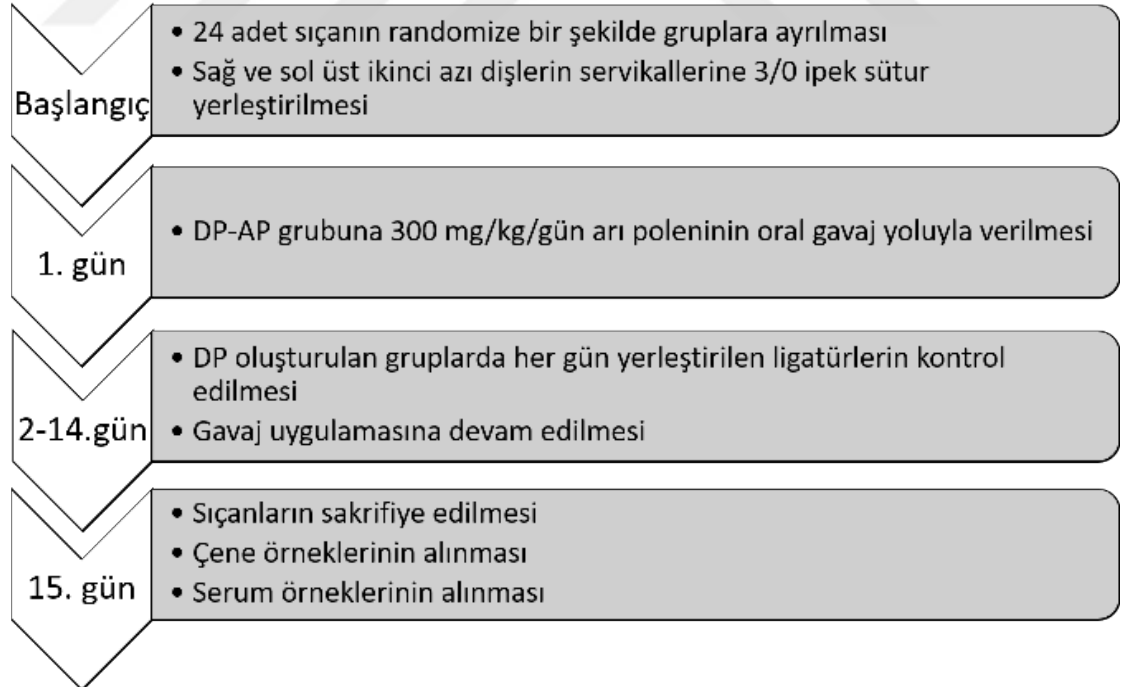
Arı Poleninin Hazırlanması ve Doz Ayarlanması

Deney öncesinde sıçanlara uygulanacak dozlar için yapılan literatür taramasında, arı poleni için yaygın olarak kullanılan dozlar belirlenmiş ve bu dozlar doğrultusunda gerekli ayarlamalar yapılmıştır. Arı poleni dozu günlük 300 mg/kg polen olarak belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan arı poleni Düzce Üniversitesi Arıcılık Araştırma, Geliştirme ve Uygulama Merkezi'nden temin edilmiştir. Çalışmada Düzce bölgesinden 2024 yılında hasat edilmiş arı poleni kullanılmıştır. Literatür bilgilerinin ışığında 300 mg/kg/gün arı poleni ekstratı günlük olarak distile su içerisinde çözdürülerek hazırlandı. Her uygulamada toplam 4ml gavaj yoluyla verildi.



Fotoğraf 3-3. Arı poleni çözeltisi

Sıçanlar ligatürleme sonrası 15. Günde kardiyak kanları alınarak sakrifiye edildi. Üst çene kafatasından ayrıldıktan sonra %10'luk formaldehit solüsyonunda fikse edilerek incelenmek üzerine histoloji laboratuvarına gönderildi. Çalışma protokolü **Şekil 3-2**'de özetlendi.



Şekil 3-2. Deney Aşamaları

3.4 Histolojik Değerlendirme

Histolojik, histomorfometrik ve immunohistokimyasal değerlendirmeler Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi.

3.4.1 Histopatolojik Değerlendirme

Histomorfolojik inceleme için ratlardan sagittal düzlemde diş ve kemik dokuyu içerecek şekilde kesitler alınarak %10'luk formalin içinde fikse edilmiştir. 24 saatlik %10'luk formalin fiksasyonu sonrasında dokular dekalsifikasyon işlemi için pH 7.4 %10'luk EDTA dekalsifikasyon solüsyonu olan Osteodec (Bio-Optica) içerisine alınmıştır. Kemik dokunun kesilebilmesi değerlendirilerek kolay bir şekilde kesit alınabilecek düzeye gelene kadar üç hafta süre ile Osteodec içerisinde bekletilmiştir. Dekalsifikasyon sonrası dokular distile su ile yıkanıp yüksek alkol serisi ve ksilenden geçirilerek parafin içerisine gömüldü. Hazırlanan parafin bloklardan 3 µm kalınlığında kesitler alınarak hematoksilin-eozin boyası ile boyanarak histopatolojik inceleme yapıldı.

Histopatolojik incelemede, enflamasyon bulgularının değerlendirilmesinde inflamatuvar hücre skorlaması dikkate alındı. İnflamatuvar hücre skorlaması, inflamatuvar hücre infiltrasyonunun histopatolojik olarak değerlendirilmesi ve hücrenin varlığının skorlanması ile yapılmıştır. Skorlama aşağıdaki kriterlere göre gerçekleştirildi (246).

Skor 0: Hücrelerin olmaması

Skor 1: Minimum düzeyde hücre olması

Skor 2: Orta düzeyde hücre olması

Skor 3: Yüksek düzeyde hücre olması

3.4.2 Histomorfometrik Değerlendirme

Alveoler kemik kaybı(AKK), mine-sement sınırı(MSS) ile alveoler kemik kreti(AKT) arasındaki mesafenin ölçülmesi ile belirlendi. MSS ile AKT arasındaki

mesafe değerleri mikrometre ‘ μm ’ cinsinden değerlendirildi. Alveoler kemik kaybı ölçümleri ikinci azı dişinin interdental bölgesinde gerçekleştirildi (246). Ratlarda lezyonun insanlardaki gibi diş kökü yüzeyi boyunca uzanması yerine, lezyonun en apikal sınırının interdental dokuların merkezine yerleşmiş olması buradaki ölçüm yerinin belirlenmesinde referans alınmıştır (247). Hematoksilen&Eozin boyalı kesitlerdeki lineer değişiklikler Leica DM 2000 LED marka ışık mikroskopunda incelendi.

3.4.3 İmmunohistokimyasal Değerlendirme

Parafin bloklardan 3 μm kalınlığında kesitler alınarak RANKL ve OPG immunohistokimyasal boyaları uygulanmıştır. BIOSS Antibodies Inc, Woburn MA – USA firmasından tedarik edilen; bs-0747R RANKL [Polyclonal] antikoru ile 1:300 dilüsyon oranıyla 60 dakika antikor inkübasyonu uygulanmıştır. Antijen Retrieval yöntemi için ROCHE/ Cell Conditioning 1 (CC1) (EDTA) ile CC1 60 dakika Standart protokolü yapılmıştır.

BIOSS Antibodies Inc, Woburn MA – USA firmasından tedarik edilen; bs-0431R OPG [Polyclonal] antikoru ile 1:300 dilüsyon oranıyla 60 dakika antikor inkübasyonu uygulanmıştır. Antijen Retrieval yöntemi için ROCHE/ Cell Conditioning 1 (CC1) (EDTA) ile CC1 60 dakika Standart protokolü yapılmıştır. Sekonder görüntüleme için ROCHE/ UltraView Universal DAB Detection Kit ile Standart UltraView IHC Protokolü uygulanmıştır, tüm işlemler ROCHE/Ventana BenchMark XT IHC Stainer cihazında (Tucson AZ – USA) yapılmıştır.

RANKL ve OPG immunohistokimyasal boyaları interradiküler alanda değerlendirilerek 0-3 (0: boyanma yok, 1: hafif boyanma, 2: orta derecede boyanma, 3: şiddetli boyanma) olarak semikantitatif skorlanmıştır (250). Kesitler LEICA DM 2000 LED marka ışık mikroskopunda değerlendirilmiştir. INFINITY 3 ANALYZE Release 6.5 görüntüleme sistemi ile histomorfometrik analiz yapılmış olup, hematoksilen eozin boyalı kesitler ve immunohistokimyasal boya kesitleri farklı büyütmelemlerde fotoğraflanmıştır.

3.5 Biyokimyasal Değerlendirme

Çalışmada, deney sürecinin sonunda tüm sıçanlardan kan örnekleri alındı. Sıçanlar anestezi altındayken kardiyak kan örnekleri alınmış ve sakrifiye bu yolla gerçekleştirilmiştir. Alınan kan örnekleri sarı kapaklı 5 ml'lik jelli vakumlu serum separatör tüpü (SST) içerisine alınarak +4°C'de 1200 g ve 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Alikotlanan serum örnekleri analiz yapılncaya kadar -80 °C'de muhafaza edildi. Preanalitik etkilerin deneyimize olası olumsuz etkisini engellemek için tüm örneklerin toplanması, taşınması, işlenmesi ve saklanması aynı prosedürler uygulandı ve tüm örneklerin analizleri eşzamanlı gerçekleştirildi. Serum örneklerinden elde edilen tüm pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar sitokin seviyeleri, her sitokine özel ELISA test kitleri kullanılarak ölçüldü. (BT LAB Rat Interleukin 4, IL-4 ELISA Kit,E0133Ra/BT LAB Rat Interleukin 6, IL-6 ELISA Kit,E0135Ra)

3.6 İstatistiksel Analiz

Çalışmaya başlamadan önce bir gruba düşen minimum örnek sayısı Power analizi ile belirlendi. Buna göre %80 güçte, %20 kayıp oranı göz önünde bulunduruldu ve grup başına olması gereken hayvan sayısının 8 olduğu tespit edildi.

Bu çalışmada verilerin tanımlayıcı istatistikleri (sayı, yüzde, ortalama, standart sapma, medyan, minimum ve maksimum) verilmiştir. Normal dağılım varsayımı Shapiro Wilk testi ile kontrol edilmiştir. Normal dağılıma sahip olan bağımsız üç ve daha fazla grubun karşılaştırılması için ANOVA testi ve normal dağılım olmadığında ise Kruskal Wallis testi kullanılmıştır. Kategorik değişkenleri arasındaki ilişkinin test edilmesinde örneklem boyutu varsayımı (beklenen değer >5) karşılanmadığı durumlarda ise Fisher's Exact testi uygulanmıştır. Analizler IBM SPSS 25 programında gerçekleştirilmiştir ve $p<0.05$ olan değerler anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Bu çalışmaya 24 adet erkek Albino Wistar sıçan kullanılarak başlandı ve 24 adet sıçan ile çalışma bitirildi. Sıçanların 16 adedinde DP oluşturmak amacıyla üst çene sağ ve sol 2. azı dişlerin servikaline ligatür bağlandı. DP başlatılmasından sakrifikasyon zamanına kadar, 14 gün boyunca ligatürlerin dişlerin etrafında kaldığı gözlemlendi.

Çalışmamızın birincil sonucu, immunohistokimyasal değerlendirmede RANKL skorunun arı poleni uygulaması ile artması, OPG skorunun arı poleni uygulaması ile azalmasıdır. Sekonder sonuç ise histopatolojik ve histomorfometrik değerlendirmeler ve serum inflamatuvar marker seviyelerindeki değişimdir.

4.1 Biyokimyasal Parametrelerin Değerlendirilmesi

Çalışmada sakrifikasyon gününde 24 adet sıçan sakrifiye edildi. Sakrifiye işleminden sona tüm sıçanlardan kardiyak kan örneği alınarak çalışma tamamlandı.

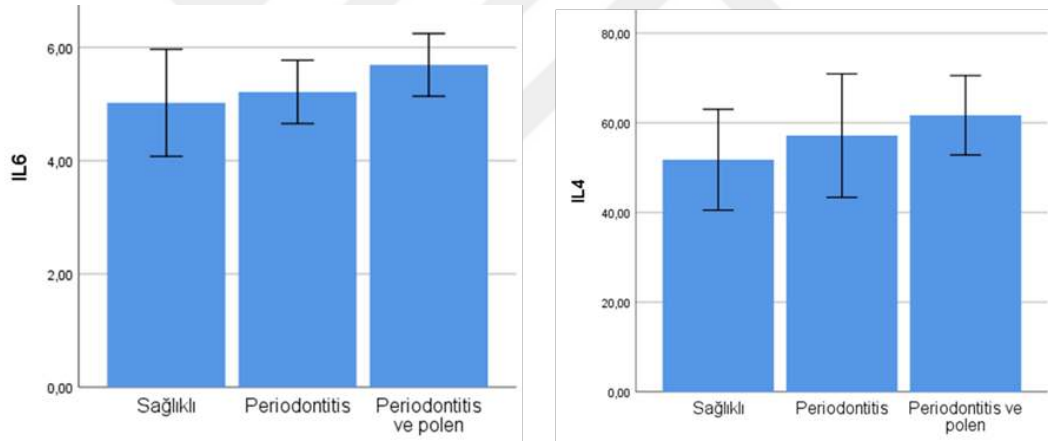
4.1.1 Serum IL-6 ve IL-4 seviyelerinin değerlendirilmesi

IL-6 ortalaması sağlıklı grupta $5,02 \pm 1,13$ (medyan: 4,72), periodontitis grubunda $5,22 \pm 0,67$ (medyan: 5,28) ve periodontitis ve polen grubunda $5,69 \pm 0,66$ (medyan: 5,62) olarak bulunmuştur. IL-4 ortalaması ise sağlıklı grupta $51,77 \pm 13,46$ (medyan: 54,28), periodontitis grubunda $57,15 \pm 16,47$ (medyan: 62,47) ve periodontitis ve polen grubunda $61,68 \pm 10,6$ (medyan: 63,15) olarak hesaplanmıştır. Çalışma gruplarında IL-4 ve IL-6 seviyelerinde anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p < 0,05$) (Tablo 4-1).

Tablo 4-1. Çalışma gruplarındaki serum IL-6 (ng/L) ve IL-4 (ng/L) seviyeleri*

		Min.-Maks.	Ort.±S.S.(Medyan)	Test İstatistiği	p
IL-6 (ng/L)	Sağlıklı (n=8)	3,52-6,79	5,02±1,13(4,72)	1,316	0,289
	Periodontitis (n=8)	3,91-5,91	5,22±0,67(5,28)		
	Periodontitis ve polen (n=8)	5,03-7,11	5,69±0,66(5,62)		
IL-4 (ng/L)	Sağlıklı (n=8)	25,18-67,81	51,77±13,46(54,28)	1,046	0,369
	Periodontitis (n=8)	35,73-80,13	57,15±16,47(62,47)		
	Periodontitis ve polen (n=8)	47,46-76,13	61,68±10,6(63,15)		

*One way ANOVA

**Şekil 4-1.** Çalışma gruplarındaki serum IL-6 (ng/L) ve serum IL-4 (ng/L) seviyelerini gösteren histogram grafikleri

4.2 Histolojik Parametrelerin Değerlendirilmesi

4.2.1 Histomorfometrik Değerlendirme

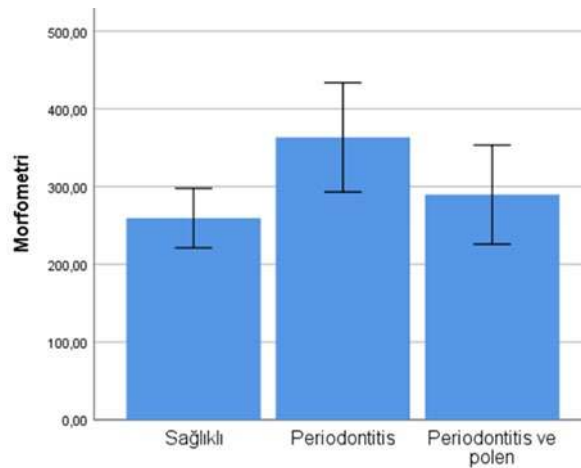
Bu çalışmada ikinci azı dişi çevresi alveolar kemik kayıplarının değerlendirilmesi amacıyla MSS ile AKT arasındaki mesafe değerleri incelenmiştir. **(Fotoğraf 4-1)** Çalışma gruplarındaki kemik kayıp düzeyleri **Tablo 4-2**'de özetlenmiştir. Çalışma sonucunda 3 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı görüldü ($p>0.05$). **(Şekil 4-2).**

Tablo 4-2. Çalışma gruplarına göre histomorfometrik ölçümlerin dağılımları ve karşılaştırılması

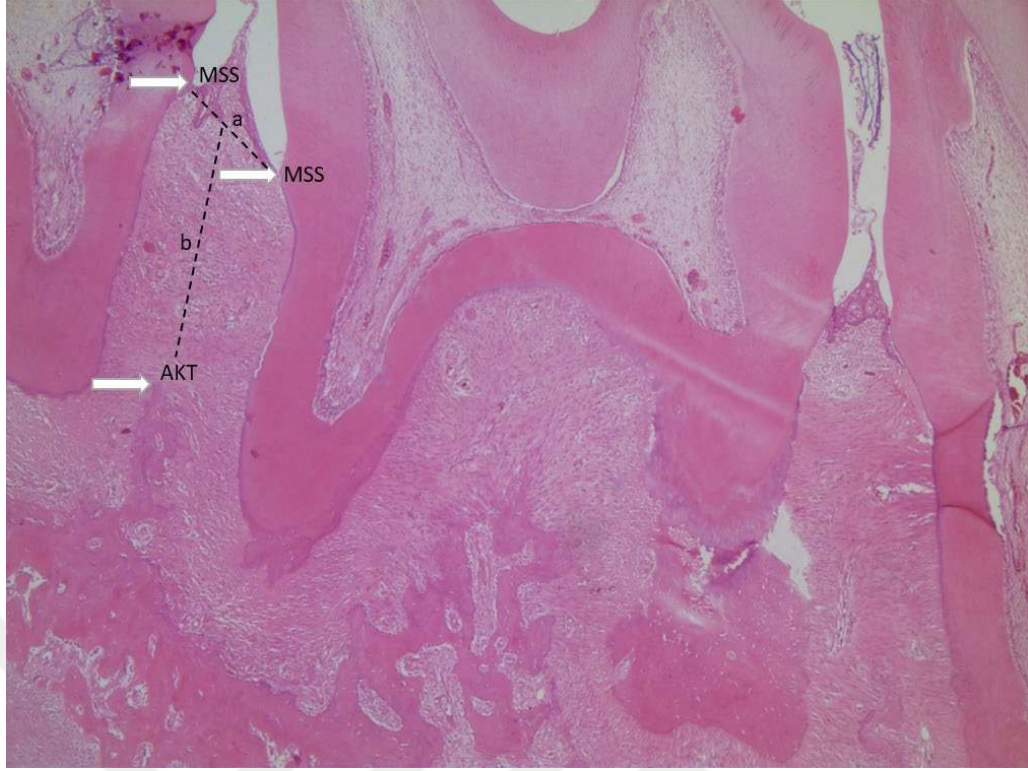
		Min.- Maks.	Ort.±S.S.(Medyan)	Test İstatistiği	p
Histomorfometri (µm)	Sağlıklı (n=8)	209,12- 326,68	259,42±45,79(250,05)	5,955‡	0,051
	Periodontitis (n=8)	288,34- 534,93	363,31±84,08(335,55)		
	Periodontitis ve polen (n=8)	179,54- 370,89	289,62±76,24(314,84)		

‡: Kruskal Wallis testi

Çalışma gruplarına göre histomorfometrik ölçümlerin dağılımları tabloda verilmiştir (Tablo 2). Kontrol grubunda histomorfometrik ölçüm 259,42±45,79 (medyan: 250,05), periodontitis grubunda 363,31±84,08 (medyan: 335,55) ve periodontitis olup polen verilen grupta 289,62±76,24 (medyan: 314,84) olarak ölçülmüştür. Çalışma gruplarına göre ölçümler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık elde edilmemiştir ($p>0,05$).



Şekil 4-2. Histolojik kemik kaybı ölçümlerinin histogram grafiği



Fotoğraf 4-1. Alveolar kemik kaybının ölçümleri, H&E boyama,40x büyütme.

MSS: Mine sement sınırı. **AKT:** Alveolar kret tepesi, **a:** Komşu dişlerin MSS'leri arasındaki çizgi, **b:** MSS ile AKT arası mesafe.

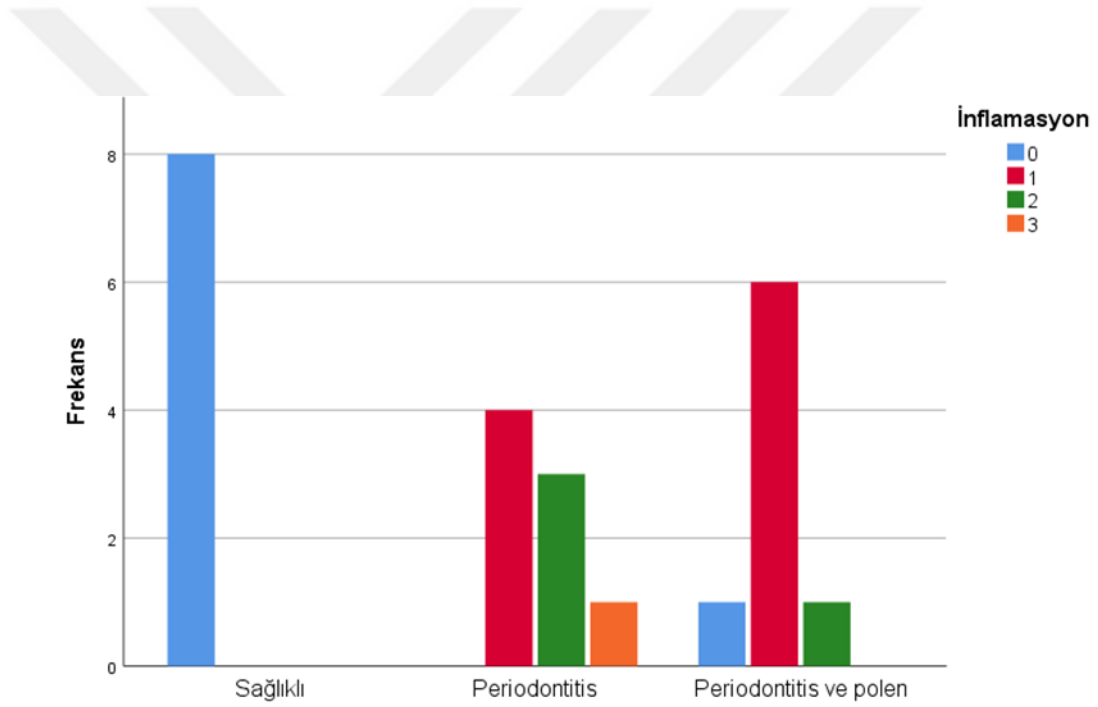
4.2.2 Histopatolojik Değerlendirme

İnflamasyon skorları **Tablo 4-3'**de özetlenmiştir. DP grubundaki inflamasyon skoru DP-AP ve PS grubuna göre anlamlı yüksektir. Analiz sonucunda tüm çalışma grupları ile inflamasyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p<0,05$). (**Şekil 4-3**). Sağlıklı grupta inflamasyon görülmezken, periodontitis grubunda inflamasyon seviyesi arttıkça periodontitis oranının da arttığı gözlenmiştir. DP-AP polen grubunda ise inflamasyon skorunun çoğunlukla 1 olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4-3. Çalışma gruplarına göre inflamasyon skorlarının dağılımları

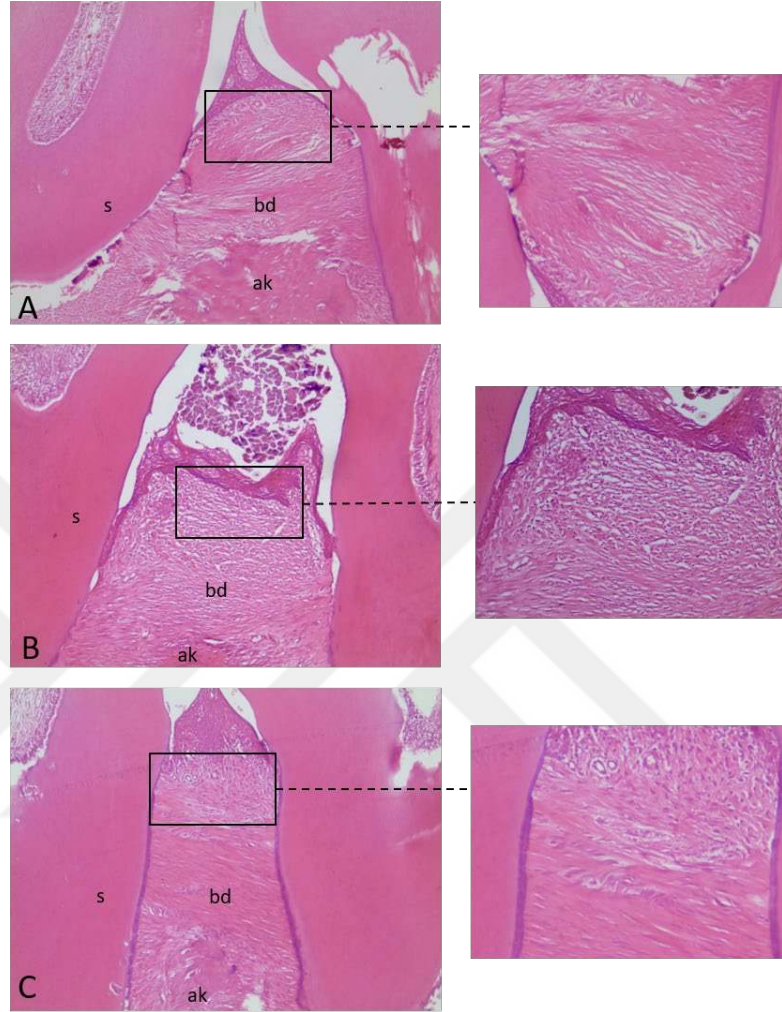
Periodontitis ve											
Sağlıklı				Periodontitis			Polen				
İnflamasyon	n	%	%G.	n	%	%G.	n	%	%G.	Test	p
										İstatistiği	
0	8	88,9	100,0	0	0,0	0,0	1	11,1	12,5	21,525	<0,001*
1	0	0,0	0,0	4	40,0	50,0	6	60,0	75,0		
2	0	0,0	0,0	3	75,0	37,5	1	25,0	12,5		
3	0	0,0	0,0	1	100,0	12,5	0	0,0	0,0		

*Fisher's Exact testine göre anlamlılık



Şekil 4-3. Çalışma gruplarına göre inflamasyon skoru dağılımlarına ait kutu grafiği

Deney gruplarına ait Hematoksilen&Eozin boyamaları **Fotoğraf 4-1**'de verilmiştir.



Fotoğraf 4-2. Işık mikroskobu altında gruplara göre inflamasyon ve alveolar kemik kayıpları, H&E boyama, 100x büyütme.

A. PS: Periodontal Olarak Sağlıklı. **B.** DP: Deneysel Periodontitis **C.** DP-AP: Deneysel Periodontitis ve Arı Poleni. **ak:** Alveolar kret, **s:** Sementum, **bd:** Bağ dokusu.

4.2.3 İmmunohistokimyasal Değerlendirme

4.2.3.1 RANKL VE OPG ÖLÇÜMLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

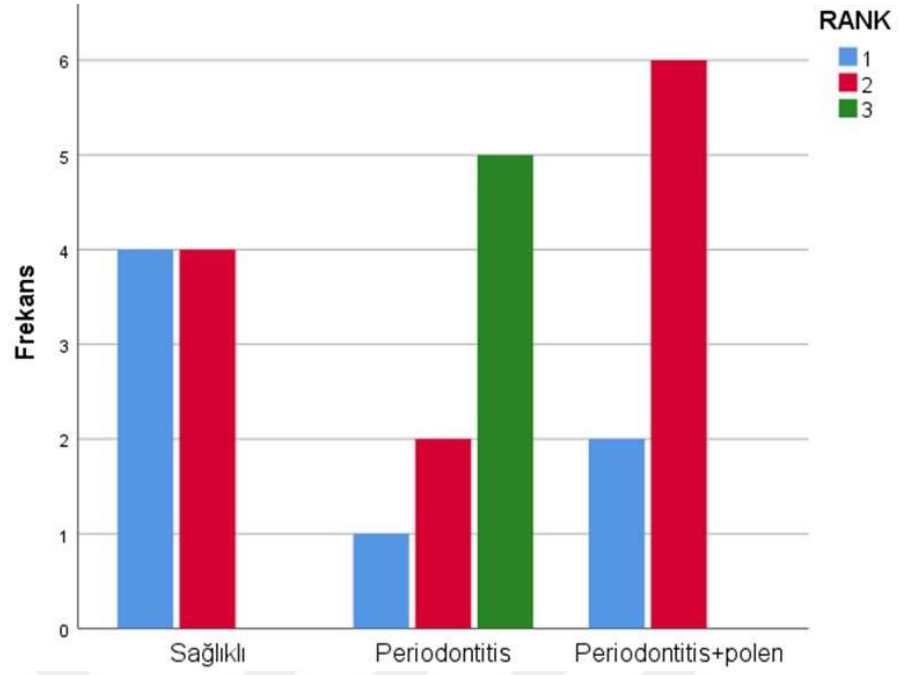
Çalışmada değerlendirilen immunohistokimyasal RANKL ve OPG boyanma yoğunluğunun skorlaması **Tablo 4-4** ve **Tablo 4-5**'te gösterilmiştir. RANKL boyanma yoğunluğunun DP-AP grubunda DP grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak daha az olduğu belirlendi ($p<0.05$). PS grubunda RANKL boyanma yoğunluğu DP ve DP-AP gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı daha azdı. OPG boyanma yoğunluğu ise DP-AP grubunda, DP grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksekti ($p<0.05$). PS grubundaki OPG boyanma yoğunluğu DP ve DP-AP gruplarından yüksekti. 3 grup arasında fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$) (**Şekil 4-4**, **Şekil 4-5**).

Tablo 4-4. Çalışma gruplarına göre immunohistokimyasal değerlendirmede RANKL boyanma yoğunluğu

RANKL	Sağlıklı			Periodontitis			Periodontitis ve Polen			Test İstatistiği	p
	n	%	%G.	n	%	%G.	n	%	%G.		
1	4	57,1	50,0	1	14,3	12,5	2	28,6	25,0	11,076	0,015*
2	4	33,3	50,0	2	16,7	25,0	6	50,0	75,0		
3	0	0,0	0,0	5	100,0	62,5	0	0,0	0,0		

* $p<0,05$ Fisher's Exact testine göre anlamlılık

Analiz sonucunda çalışma grupları ile RANKL düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p<0,05$). DP grubunda RANKL boyanma yoğunluğu 3 iken DP-AP grubunda 2, sağlıklı grupta ise çoğunlukla 1 skoru aldığı görüldü.



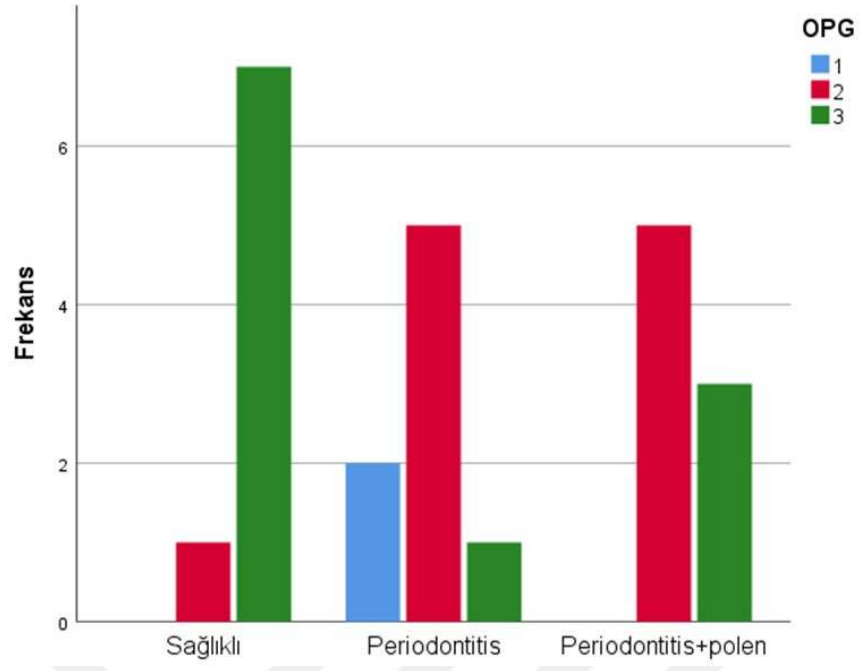
Şekil 4-4. Çalışma gruplarına göre RANKL boyanma yoğunluğu dağılımına ait kutu grafiği.

Tablo 4-5. Çalışma gruplarına göre immunhistokimyasal değerlendirmede OPG boyanma yoğunluğu

OPG	Sağlıklı			Periodontitis			Periodontitis ve Polen			Test İstatistiği	p
	n	%	%G.	n	%	%G.	N	%	%G.		
1	0	0,0	0,0	2	100,0	25,0	0	0,0	0,0	10,335	0,017*
2	1	9,1	12,5	5	45,5	62,5	5	45,5	62,5		
3	7	63,6	87,5	1	9,1	12,5	3	27,3	37,5		

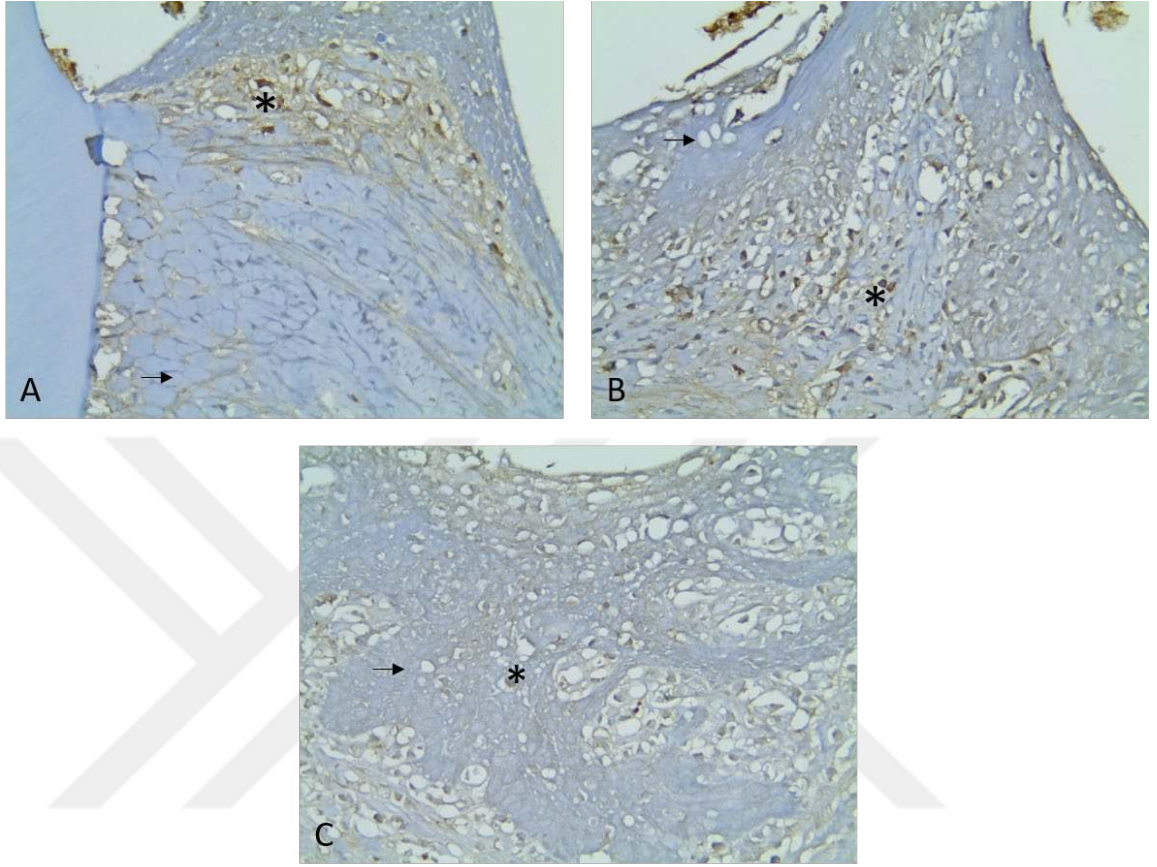
*p<0,05 Fisher's Exact testine göre anlamlılık

Test ve kontrol grupları ile OPG boyanma yoğunlukları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir (p<0,05). PS kontrol grubunda çoğunlukla OPG skoru 3 iken DP ve DP-AP grubunda çoğunlukla 2 skoru almıştır.



Şekil 4-5. Çalışma gruplarına göre OPG boyanma yoğunluğu dağılımına ait kutu grafiği.

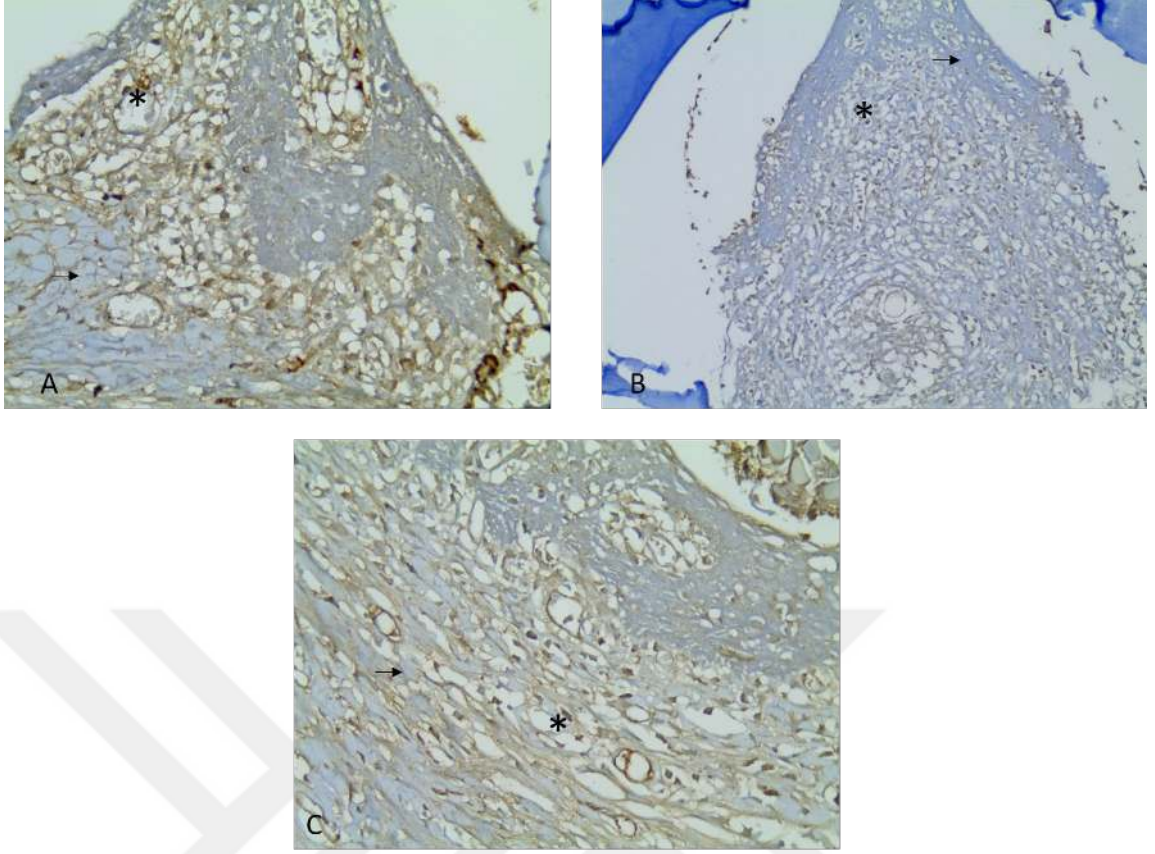
RANKL ve OPG boyamalarına ait kesitler **Fotoğraf 4-2 ve 4-3**'te verildi.



Fotoğraf 4-3. Işık mikroskopunda gruplara göre RANKL immün boyanmasına ait histolojik kesitler, 400X büyütme.

A. PS: Periodontal Olarak Sağlıklı. **B.** DP: Deneysel Periodontitis **C.** DP-AP: Deneysel Periodontitis ve Arı Poleni

Şiddetli immunpozitif boyanmış hücreler (*) ve zayıf immunpozitif boyanmış hücreler (→)



Fotoğraf 4-4. Işık mikroskopunda gruplara göre OPG immün boyanmasına ait histolojik kesitler, 400X büyütme.

A. PS: Periodontal Olarak Sağlıklı. B. DP: Deneysel Periodontitis C. DP-AP: Deneysel Periodontitis ve Arı Poleni

Şiddetli immunpozitif boyanmış hücreler (*) ve zayıf immunpozitif boyanmış hücreler (→)

5. TARTIŞMA

Bu araştırmada, DP ile oluşturulan sıçan modellerinde arı poleni uygulamasının alveolar kemik yıkımı ve inflamatuvar parametreler üzerindeki etkileri incelenmiştir. Arı polenin, periodontal hastalıkta dental plağın yol açtığı inflamasyonu ve alveolar kemik kaybını azaltabileceği hipotezi ortaya konmuştur. Bilgilerimize göre, bu çalışma, arı polenin deneysel periodontitis modelinde periodontal kayıp üzerindeki etkilerini değerlendiren ilk araştırmadır.

Çalışma DP modeli oluşturulan sıçanlar üzerinde yapıldı. Literatürde, DP modelleri için primatlar, tavşanlar, mini domuzlar, köpekler, fareler ve sıçanlar gibi farklı hayvan türlerinin kullanıldığı gözlemlenmektedir. Bununla birlikte, DP modelinin oluşturulmasına uygun hayvanlar arasında sıçanlar ve fareler ön plana çıkmaktadır (248). Sıçanlar, azı dişi bölgesindeki periodontal anatomilerinin insanlarla benzerlik göstermesi nedeniyle sıklıkla deneysel periodontitis modellerinde kullanılmaktadır (249). Sıçanlarının deney hayvanı olarak üretimi ve bakımının diğer deney hayvanlarına kıyasla ucuz ve kolaydır (247). Bu avantajlarının yanında, doğal olarak periodontitise dayanıklı olması, periodontal hastalığın insandaki kronik hastalık karakterinden farklı olarak akut hastalık paterni göstermesi ile ayrılması, doku analizi için boyutlarının küçük olması, periodontitis modeli oluşturmak ve tedavi uygulamanın zor olması gibi dezavantajları bulunmaktadır (248). Literatürde proinflamatuvar sitokin seviyelerinin dişi ve erkek sıçanlarda farklılık göstermesi nedeniyle bu çalışmada erkek sıçanlar tercih edildi (250, 251). Çalışmamızda 8-12 haftalık 24 adet erkek Albino Wistar erkek sıçan kullanıldı.

Literatür değerlendirildiğinde, DP oluşturmanın farklı yöntemleri mevcuttur. DP oluşturma yöntemlerine; dişetine LPS enjeksiyonu (252), mandibular ya da maksiller azı dişlerin etrafında ipek sütür ile ligatürleme uygulaması (253), cerrahi yöntem ile defekt oluşturulması (254) ve gavaj uygulaması (255) örnek verilebilir. Çalışmamızda ligatür ile indüklenen deneysel periodontitis modelini oluşturmayı seçtik. Ligatür ile oluşturulan deneysel periodontitis modelinde, ligatür dentogingival bölgede dokuyu travmatize ederek doku bütünlüğünü bozmaktadır. Bu durum, yoğun konak ve plak etkileşimiyle

birlikte inflamasyonu artırır ve periodontal dokularda hasarın ilerlemesine yol açar. Kullanılan ipek suture ise multiflament yapısı sebebiyle plak birikimini attırmaktadır. Mikrobiyal birikimin artması ile yıkım hızlı seyreder. Akut inflamasyon zaman içinde kronik inflamasyona dönüşmektedir (256, 257). Bu sebeplerle, ligatür uygulamasının plak birikimi ile ilişkili periodontal hastalıkların doğal seyrine uygun olduğu kabul edilmektedir (256, 258, 259). Bu nedenle, bu çalışmada DP modeli, sıçanların ikinci azı dişleri çevresine 3/0 ipek suture yerleştirilerek oluşturulmuştur. İpek suturen yüzey yapısına bağlı olarak kalınlaşması, plak birikimini artırma potansiyeline sahipken, aşırı kalınlık ise ligatürün yerleştirilmesini güçleştirebilir. Bu nedenle, çalışmamızda genellikle tercih edilen 3/0 kalınlık kullanılmıştır (258, 260).

Literatür incelemelerinde, DP modelinin sıçanların alt veya üst çenelerinde yer alan dişlerde oluşturulduğuna yönelik farklı çalışmalar bulunmuştur (256) (258, 261). Literatürdeki çalışmalarda ligatürlerin ise sıçanların farklı azı dişleri çevresine yerleştirildiğini göstermektedir (262-265). Üst çenede, spongiöz kemik yapısının başka bir ifadeyle kemiğin düşük yoğunluğu nedeniyle yıkımın daha hızlı meydana geldiği belirtilmiştir (266). Ayrıca, üst çene, deneysel çalışmalar açısından daha kolay erişilebilir ve uygulanabilir bir bölge olarak öne çıkmaktadır (267). Bu çalışmada, elde edilen bulgular doğrultusunda üst çene ikinci azı dişlerinin servikal alanlarına 3/0 ipek ligatür yerleştirilerek deneysel periodontitis modeli oluşturulmuştur.

Deneysel periodontitis modeli, farklı araştırmalarda farklı zaman aralıklarında oluşturulmuş olup, bu durum modelin zamanlamasına bağlı olarak değişken sonuçların elde edilmesine neden olmuştur (256, 268, 269). Sıçanlarda 7 gün (270), 11 gün (271), 14 gün (272) ve daha uzun süreler gibi farklı süre zarfları içerisinde deneysel periodontitis oluşturulmuştur. Kuhr ve ark (256), sıçanların üst ikinci azı dişlerine ligatür yerleştirerek, sakrifikasyon sonrası 1, 15, 30 ve 60. günlerde çene örneklerinden alınan kesitlerde alveolar kemik kaybını morфометrik olarak değerlendirmiştir. Çalışma, en fazla kemik kaybının ilk 15 günde meydana geldiğini ve 30. ile 60. günlerde kemik kaybının sınırlı bir artış gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu bulgular ışığında, deneysel periodontitis modeli bu çalışmada iki haftalık bir süre zarfında oluşturulmuştur.

Literatürde farklı arı ürünleri ile ilgili çalışmalarda arı poleni takviyesi gastrik beslenme yoluyla gavaj ile (258, 273) ve oral yolla (274-276) uygulanmıştır. Doz oranları değerlendirildiğinde, literatürde 100 mg/kg/gün (277), 200 mg/kg/gün (226), 300 mg/kg/gün (210) gibi farklı miktarlar uygulanmıştır. Köseadağ ve ark. yaptığı çalışmada, farklı arı ürünlerinin kronik inflamasyon üzerinde etkileri 7 gün boyunca oral gavaj yöntemi ile verilerek incelenmiştir. Bu çalışmada 300 mg/kg/gün dozda oral gavaj ile verilen arı poleni, diğer arı ürünlerine kıyasla, en yüksek anti-inflamatuar etki göstermiştir (210). Bu bilgiler ışığında çalışmamızda deneysel periodontitis oluşturulan sıçanlarda arı poleni uygulaması günde 300 mg/kg dozunda ve oral gavaj yöntemi ile gerçekleştirildi.

Çalışmamızın sonucu olarak, sağlıklı grup, deneysel periodontitis grubu ve arı polenin verildiği test grubu arasında inflamasyonun değerlendirilmesinde histopatolojik ve histomorfometrik analizler kullanılmıştır. Histopatolojik incelemede, inflamasyon bulgularının değerlendirilmesinde inflamatuvar hücre skorlaması dikkate alındı. İnflamatuvar hücre skorlaması, inflamatuvar hücre infiltrasyonunun histopatolojik olarak değerlendirilmesi ve hücrenin varlığının skorlanması ile yapılmıştır. Deneyin sonucunda histopatolojik incelemede, inflamasyon skorları karşılaştırıldığında, tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$). Arı poleni verilen periodontitis grubundaki inflamasyon düzeyi; sadece deneysel periodontitis oluşturulmuş gruba oranla daha düşüktü ve bu sonuç istatistiksel olarak anlamlıydı. Arı poleni, beklenen sonuçla paralel olarak, arı poleni takviyesi verilen grupta, deneysel periodontitis grubuna göre inflamatuvar hücre göçünü azalttı.

Literatürde, arı polenin inflamasyon üzerindeki etkisine yönelik farklı çalışmalar mevcuttur. Eteraf ve ark. her biri 6 hayvandan oluşan dört gruba ayırdıkları toplam 24 adet erkek Wistar Albino cinsi sıçan kullandıkları deneyde arı poleni özütünün hava kesesi iltihabı modelinde anti-inflamatuar ve anti-anjiyogenez etkilerini incelemişlerdir. Çalışmada kontrol grubu hariç diğer 3 gruba farklı dozlarda (50, 100 ve 200 mg/kese) arı poleni verilmiştir. Deney sonunda, lökosit sayısı bir ışık mikroskobu ile değerlendirilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda arı poleni özütünün eksüda hacmini, lökosit birikimini, granülasyon doku ağırlığını

önemli ölçüde azalttığı sonucuna ulaşmışlar ve bu sonucun flavonoidlerin yüksek konsantrasyonları sayesinde nitrik oksit üretiminin inhibe edilmesiyle uyumlu gördüklerini bildirmişlerdir (17). Bu çalışma, mevcut çalışmamızın sonuçlarını destekler niteliktedir. Benzer şekilde, Maruyama ve ark. Cistus türlerine ait arı polenin, sıçanlarda karragenan ile indüklenen pençe ödemi modelinde anti-inflamatuvar etkisi araştırmış ve arı polenin metanol özütündeki flavonoidlerin, nitrik oksit üretimini azalttığı ve siklooksijenaz aktivitesini inhibe ettiği bildirilmiştir (226). Literatürü destekler nitelikte olan çalışmamız, arı polenin periodontal inflamasyon üzerindeki etkisini inceleyen ilk çalışmadır.

Kronik enflamatuvar hastalık patogenezinde çeşitli proinflamatuvar sitokinlerin, özellikle IL-1, IL-6, IL-12, IL-17, IL-18, IL-21, TNF- α ve IFN- γ 'nin, periodontitisin patogenezinde önemli bir rol oynadığı belirtilmiştir (168). Özellikle IL-1 ve IL-6 gibi sitokinler, periodontitisin ilerlemesiyle ilişkili olarak B hücresi ve plazma hücresi yanıtlarında üretildikleri bilinmektedir. IL-6, LPS, IL-1 ve TNF- α gibi faktörlere yanıt olarak epitel hücreleri, lenfositler, monositler ve fibroblastlar tarafından salgılanır. Yapılan in vitro çalışmalar, IL-6'nın osteoklast oluşumunu uyardığını göstermektedir (278). Kemik yıkımı ile de ilişkilendirilen bir pro-inflamatuvar sitokindir. Benzer şekilde, cerrahi olmayan periodontal tedavi sonrasında, sistemik IL-6 düzeylerinde bir azalma gözlemlenmiş ve bu azalma, periodontal durumun klinik iyileşmesiyle paralel olarak gerçekleşmiştir (279). Köseadağ ve ark. kronik inflamasyon üzerinde arı ürünlerinin etkilerini inceledikleri çalışmanın sonucunda, arı polenin anti-inflamatuvar etkisinin incelenmesi için oral gavaj yöntemi ile verilmesinin pro-inflamatuvar bir sitokin olan serum IL-6 seviyesini düşürdüğü bildirilmiştir (20). Bu bilgiler ışığında, çalışmamızda, arı polenin bu mekanizma ile periodontal hastalıkta IL-6 seviyesini azaltarak inflamasyonu ve inflamasyona bağlı alveolar kemik kaybını azaltması beklenmiş ve serum IL-6 seviyeleri değerlendirilmiştir. Çalışmamızın sonucunda, IL-6 seviyesinin bu bilgilerle uyumlu olarak sağlıklı gruba oranla periodontitis grubunda daha yüksek olması literatürü destekler nitelikteydi fakat gruplar arasında anlamlı bir fark yoktu. Arı poleni takviyesi verilen grupta ise IL-6 seviyesi diğer iki gruptan daha yüksekti fakat bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildi. Literatürde, Qing ve ark. 2020 yılında yaptıkları bir çalışmada, akut stresin, kafes değiştirme ve sosyal izolasyon gibi standart laboratuvar modelleriyle, dolaşımdaki IL-6 seviyelerinde

belirgin bir artışa yol açtığı gözlemlenmiştir (280). Lemay ve ark. yaptığı psikolojik stresin ratlarda plazma IL-6 seviyeleri üzerindeki etkisini inceleyen bir başka çalışmada da benzer olarak; psikolojik strese maruz kalmanın IL-6'nın plazma konsantrasyonunu yükseltebileceğini ortaya koymuştur (281). Çalışmamızda sadece arı poleni takviyesi yapılan grubun 14 gün boyunca oral gavaj uygulamasına maruz bırakılması ve diğer gruplara gavaj işleminin uygulanmamış olması, bunun sonucu olarak gavaj grubundaki ratlarda stres kaynaklı IL-6 seviyesinin yükselmesi ile açıklanabilir. İlave olarak bu sonuç; oral gavaj işleminin, ratlarda çeşitli taşıyıcıların gavaj yoluyla uygulanması ve plazma kortikosteroid seviyelerinin artmasıyla tanımlanan stres tepkisini indüklemesi sonucu ile uyumludur (282).

Anti-inflamatuar bir sitokin olan İnterlökin-4 (IL-4), Th2 hücrelerinin çoğalmasını teşvik ederken, Th1 hücrelerinin çoğalmasını inhibe eder ve Th1 aracılı bağışıklık yanıtını baskılar. Bu mekanizma, IL-4' ün periodontitisin patogenezindeki rolünü öne çıkarmaktadır (283). Literatürde IL-4'ün, periodontitiste dokuda inflamasyon hücrelerin göçünü engellediği ve osteoklast oluşumunu inhibe etme yoluyla periodontal kemik kaybını azalttığı bir çalışma da mevcuttur (284). Robati ve ark. gerçekleştirdiği; kontrol grubunda 25 sağlıklı bireyin ve test grubunda 25 periodontitis hastasının bulunduğu toplam 50 katılımcı içeren çalışmada, serum IL-4 seviyelerinin karşılaştırılması sonucunda serum IL-4 seviyesi kontrol grubunda test grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı bildirilmiştir (285). Buna karşılık, Acharya ve ark. yaptığı toplam 80 katılımcının eşit gruplara ayrıldığı klinik çalışmada, kronik periodontitis hastaların serum IL-4 seviyeleri sağlıklı grup ile karşılaştırılmış, çalışmanın sonucunda bu gruplar arasında serum IL-4 seviyelerinde anlamlı bir fark görülmediği bildirilmiştir (286). Bu çalışmada bu sonucun, IL-4'ün anti-inflamatuar bir sitokin olarak bilinmesine karşılık, birden fazla sitokin salınımında etkileşimde bulunduğu ve inflamasyondaki rolünün kompleks olması ile açıklanmıştır (287) Benzer şekilde, Rabelo ve ark. yaptığı, eşit büyüklükte dört gruba ayrılmış altmış deneğin katıldığı çalışmada, periodontitis grubundaki hastalara cerrahi olmayan periodontal tedavi uygulanmıştır. Cerrahi olmayan periodontal tedavi uygulanan hastaların tedaviden 30 gün sonra alınan serum örneklerinde; periodontal hastalık durumundaki ve tedavi sonrası serum IL-4 seviyelerini karşılaştırmış, anlamlı bir fark bulunmamıştır (288). Bizim çalışmamızda da, kronik periodontitis ile sağlıklı grup arasında serum

IL-4 seviyeleri karşılaştırıldığında, gruplar arası anlamlı bir fark bulunamamıştır. Çalışmamızda, deneysel periodontitis grubu ile arı poleni takviyesi verilen deneysel periodontitis oluşturulmuş sıçanların serum IL-4 seviyeleri kıyaslandığında ise, arı poleni takviyesi verilen grupta istatistiksel olarak anlamlı olmamasına karşın serum IL-4 seviyesi daha yüksek bulunmuştur. Çalışmamızın sonucu ile paralel olarak, Li ve ark. tarafından gerçekleştirilen bir hücre kültürü çalışmasında, polen bileşenlerinin anti-inflamatuar aktivite gösterdiği belirlenmiştir (251). Buna karşılık, Maruyama ve ark. etanol ve su bazlı ekstraktlarla elde edilen iki farklı polen örneğinin sıçanlarda ayak ödemi üzerindeki anti-inflamatuar etkilerini incelemişlerdir. Araştırma, etanol ekstraktının hafif bir anti-inflamatuar etkinlik gösterdiğini, buna karşın suyla yapılan ekstraktın bu etkiye sahip olmadığını ortaya koymuştur (226). Maruyama ve ark. benzer şekilde bizim çalışmamızda da polen su ekstratı ile hazırlanmış ve oral yolla verilmiştir.

Kösedağ ve ark. farklı arı ürünlerinin anti-inflamatuar etkilerini karşılaştırmak için pamuk pelet granülomu oluşturarak yaptığı deneysel çalışmada, arı poleni takviyesi verilen grupta IL-4 seviyesi, kontrol grubuna göre daha yüksek ve istatistiksel olarak anlamlıydı (20). Bu çalışma sonucunun istatistiksel olarak anlamlı olmasının, arı polenin içeriğinin farklı olmasıyla da ilgili olabileceği düşünülmektedir. Denisow ve ark. arı polenin biyolojik ve terapötik kullanımı üzerine yapılan bir derlemede, polenin anti-inflamatuar aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir. Ancak, arı polenin; farklı bölgesel köken, ekolojik habitat ve mevsimsel değişiklikler gibi çevresel faktörlere bağlı olarak içerdiği kimyasal bileşenlerin çeşitliliği ve miktarı değişmektedir ve bunun sonucunda polenin anti-inflamatur ve terapötik etkisinin de değiştirebileceği bildirilmiştir (217).

Çalışmamızın bir diğer sonucu; histomorfometrik değerlendirmede ölçümlerde sırasıyla en yüksek değer periodontitis grubunda olmak üzere, periodontitis grubunu arı poleni takviyesi verilen gavaj grubu ve son olarak da sağlıklı grup izlemektedir. Bu verilere dayanarak, arı poleni takviyesi verilen grupta kemik kaybının periodontitis grubuna göre daha az olduğu yorumu yapılabilir. Literatürde ratlarda ligatür uygulaması ile oluşturulan deneysel periodontitiste alveolar kemik kaybının gerçekleştirdiğini bildirilen çalışmalar mevcuttur (256, 266). Alveolar kemik kaybı, farklı ölçüm teknikleriyle değerlendirilebilen bir

parametre olup, bu değerlendirme mikro bilgisayarlı tomografi (μ CT) gibi üç boyutlu görüntüleme yöntemleriyle ya da histolojik ölçüm ve boyama gibi iki boyutlu analizlerle gerçekleştirilebilir (289, 290). Klinik ve radyografik modeller, periodontal hastalığın değerlendirilmesinde geçerli bir alternatif sunmasına rağmen (256), periodontal dokularda meydana gelen hücresel ve doku düzeyindeki olaylardan elde edilen nitel veriler, hastalığın yol açtığı kaybın değerlendirilmesi açısından daha kapsamlı bilgi sağlamasıyla; hastalığın patogenezi, ilerleyişi ve tedaviye yanıtları konusunda daha ayrıntılı bir bilgi birikimi oluşturarak etkili bir değerlendirme yapılmasına katkı sağlamaktadır (291). İki boyutlu kemik kaybı değerlendirmeleri, bazı araştırmalarda mesafeye dayalı ölçümler (örneğin, mine sement sınırı (MSS) ile alveolar kemik tepe (AKT) arasındaki mesafe) ile yapılırken, farklı çalışmalarda alan bazında yapılan ölçümleri içermektedir (260, 290). Uzun dönemli takiplerde ise, MSS ve AKT arasındaki mesafe ölçümünün daha güvenilir ve doğru sonuçlar sunduğu belirtilmiştir (256). Bu sebeple çalışmamızda bu yöntem seçilmiştir.

Çalışmada gruplar arasında histomorfometrik ölçümler açısından farklı değerler bulunması fakat bu farkın istatistiksel olarak anlamlı bulunmamasında; ölçümün tek noktadan yapılmasının ve kesitlerin standardize edilmemiş olmasının sebep olabileceği düşünülmektedir. Semenoff ve ark. güvenilir histomorfometrik sonuçlar elde edebilmek amacıyla, histolojik kesitlerin seçiminde standardizasyonun önemli olduğu bildirilmiştir (266). Buna karşılık literatürde belirli bir standardizasyon olmadan, görsel olarak en net kesitin seçildiği çalışmalar mevcuttur (292-294). Histolojik kesitlerdeki olası varyasyonlar, literatürdeki mevcut farklılıkların açıklanmasında önemli bir rol oynayabilmektedir (266, 295).

Literatürde arı poleni uygulamasının alveolar kemik kaybına etkisini inceleyen herhangi bir çalışma yoktur. Toker ve ark. arı ürünlerinden propolisin alveolar kemik kaybının değerlendirildiği bir çalışmada; 40 adet Wistar rat sırasıyla sağlıklı, deneysel periodontitis grubu, 100 mg/kg/gün propolis takviyesi verilen DP ve 200 mg/kg/gün propolis takviyesi verilen DP grubu olmak üzere dört gruba ayrılmıştır. Deney gruplarına propolis, gastrik beslenme yöntemi ile verilmiştir. Deneyin sonunda dokular histopatolojik olarak değerlendirilmiştir. Histomorfometrik ölçümler kıyaslandığında, propolis takviyesi verilen gruplarda

kemik kaybı istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır (258). Buna karşılık, Aral ve ark. propolisin alveoler kemik koruyucu ve hipoglisemik etkilerini inceleyen çalışmalarında ise, deney grubuna 21 gün boyunca 100 mg/kg propolis içeren günlük oral gavaj verilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda diyabetik rat grubu ile propolis takviyesi verilen diyabetik ratların bulunduğu grup arasında alveolar kemik kaybı açısından anlamlı bir fark bildirilmemiştir (296).

Literatür incelendiğinde, arı polenin kemik metabolizmasına etkilerine yönelik etkilerini inceleyen farklı yöntemlere sahip çalışmalar mevcuttur. Kafadar ve ark. 32 adet Sprague-Dawley cinsi kullanılarak oferektomi uygulanan sıçan modelinde osteoporoza bağlı kemik kaybına arı sütü ve arı polenin etkisini inceledikleri çalışmada, 12 hafta sonunda deneyin başlangıç ve sonundaki kemik yoğunluklarını kıyaslamışlardır. Lomber omurga ve proksimal femur kemik mineral yoğunluğu sonuçları arı poleni grubunda sadece oferektomi grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek olarak bildirilmiştir. Çalışmanın sonucu olarak arı poleni takviyesinin oferektomize sıçan modelinde osteoporoza bağlı kemik kaybını azalttığı gözlemlenmiştir (297). Bu çalışmayı destekler nitelikte, kemik metabolizmasında gıda faktörlerinin düzenleyici etkilerini inceleyen bir başka çalışmada, arı polenin kemik metabolizması üzerine anabolik etkileri olduğu bildirilmiştir (298). Yamaguchi ve ark. arı poleni özütünün trabeküler ve kortikal kemik dokularındaki etkilerini in vitro ve in vivo çalışmalar ile incelemiştir. İn vitro çalışmada, kemik dokuları, *Cistus ladaniferus* arı poleninden elde edilen su ya da etanolde çözündürülmüş farklı dozlara sahip özütlerle, modifiye edilmiş Eagle besiyerinde 48 saat süreyle kültüre edilmiştir. Deney sonucunda kemik dokularındaki mineral seviyesinin, arı polenin hem etanol hem de su ile oluşturulmuş çözeltisinin maruziyetinde, anlamlı bir şekilde yükseldiğini bildirmişlerdir (299). Çalışmamızda, sonucun istatistiksel olarak anlamlı olmamasına karşın, arı poleni takviyesi verilen gruptaki alveolar kemik kaybının, periodontitis grubuna göre daha az olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bu nedenle, bildiğimiz kadarıyla, mevcut çalışma arı poleni uygulanmasından sonra histomorfometrik düzeylerde periodontal doku ve kemik üzerinde bir etki göstermesi bakımından benzersizdir.

Periodontal hastalıkla ilişkili alveolar kemik yıkımında RANKL-OPG etkileşimi kritik bir rol oynamaktadır. RANKL, TNF ailesine ait çözünür bir membran proteini olup osteoklastların aktivasyonunu ve farklılaşmasını teşvik ederken, aynı zamanda osteoklast apoptozunu engeller. RANKL, RANK sunan osteoklast ve prekürsör hücrelerinin yüzeylerine bağlanarak osteoklastların farklılaşmasını ve aktive olmasını sağlar (145). RANKL yokluğunda ise kemik rezorpsiyonu azalır. OPG, RANKL ile ters etki gösteren ve RANKL ile olan etkileşimi inhibe eden çözünür bir protein olup, osteoklastogenezin azalmasına neden olur (300). Normal fizyolojik koşullarda kemik yapımı ve yıkımı arasında bulunan denge periodontal hastalıkta bozulmaktadır. Periodontitiste, RANKL/OPG oranının artmasıyla, yani OPG seviyesinin azalması ve RANKL seviyesinin yükselmesi sonucunda patolojik kemik yıkımı meydana gelir (169). Çalışmamızda, bu bilgilerle uyumlu olarak, periodontitis grubunda RANKL skorlaması, sağlıklı kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti. Aynı zamanda, arı poleni verilen deney grubunda RANKL skoru sadece deneysel periodontitis oluşturulmuş gruba oranla yüksekti ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$). OPG ise bunun tam aksine, literatürü destekler nitelikte, sağlıklı grupta en yüksekti. Arı poleni takviyesi verilen grupta OPG skorlaması, deneysel periodontitis oluşturulmuş gruba kıyasla istatistiksel olarak anlamlı biçimde daha yüksekti ($p<0.05$).

Literatürde, inflamatuvar periodontal hastalıkta, hem mikrobiyal hem de konak kaynaklı faktörlerin kemik rezorpsiyonu ve kemiğin yeniden şekillendirilmesi ile ilgili süreçlerinde rol oynadığı bildirilmiştir (148, 151). Bu mekanizmada farklı kimyasal mediyatörler karmaşık roller ile yer almaktadır. Literatürde, IL-2 ve IL-4 gibi immun regülatör rol oynayan sitokinlerin düşük seviyelerinin periodontal hastalıktaki kemik kaybına katkısı bildirilmiştir (8). Benzer şekilde, Lorenzo ve ark. IL-4, IFN-gamma ve TFG- β gibi sitokinlerin osteoklastogenezini inhibe ettiğini bildirmişlerdir (301). Çalışmamızda, IL-4 seviyesinin, arı poleni grubunda sadece deneysel periodontitis oluşturulan gruba kıyasla daha yüksek olması ve OPG skorunun da yine arı poleni grubunda daha yüksek olması bu mekanizmayı destekler niteliktedir.

Yamaguchi ve ark. arı polenin kemik üzerinde anabolik etkilerini bildirmişlerdir (298). Arı polenin kemik metabolizması üzerindeki etkilerini RANKL/OPG yolu üzerinden değerlendiren herhangi bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Farklı arı ürünlerinin bu yol üzerindeki etkilerini değerlendiren çalışmalar incelendiğinde; Kresnadi ve ark. propolis çekim soketinde kemik metabolizması üzerindeki etkilerini incelemiştir. Deney sonunda, propolis ekstratı kullanılan grupta, kontrol grubuna yani herhangi bir uygulama yapılmamış çekim soketine kıyasla immün boyamada, RANKL ekspresyonunun daha düşük, OPG ekspresyonunun daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir (302). Sıçanlarda kemik oluşumunda, propolis kemik belirteçleri üzerinde etkisini inceleyen bir başka çalışmada da propolis RANKL seviyesini azaltarak osteoklastogenezis üzerinde inhibe edici etkisi olduğu ve OPG seviyesini artırarak kemik metabolizmasında anabolik bir etki gösterdiği bildirilmiştir (303). Benzer şekilde, Gu ve arkadaşları, arı zehrinin *P. gingivalis*'in neden olduğu inflamatuvar kemik kaybına bağlı periodontitis üzerinde *in vivo* etkilerini ve RANKL'in osteoklast farklılaşmasını, aktivasyonunu ve fonksiyonunu *in vitro* düzeyde azalttığını bildirmişlerdir (304). Çalışmamızın sonucunda, propolis ve arı zehri gibi diğer arı ürünlerine benzer olarak arı polenin de, RANKL seviyesini azaltıp OPG seviyesini artırarak, periodontal hastalığa bağlı alveolar kemik yıkımını azalttığı sonucuna ulaşılmıştır. Bu sonuçlar literatürdeki çalışmaları destekler niteliktedir.

Literatür değerlendirildiğine, deneysel periodontitis oluşturulan sıçanlarda arı poleni uygulaması yapan başka bir çalışma tespit edilmediğinden bizim çalışmamız ile sonuçların tam olarak kıyaslanması mümkün olmamıştır. İlave olarak bizim çalışmamızın limitasyonları, alveolar kemik kayıpları değerlendirilirken sadece histomorfometrik olarak iki boyutlu ölçüm tekniklerinin kullanılması, arı polenin farklı dozlarının alveolar kemik kaybı ve inflamatuvar parametreler üzerinde etkisinin karşılaştırılmamış olması, serum IL-4 ve IL-6 seviyelerinin yanında dokuda lokal sitokin seviyelerinin değerlendirilmemiş olması, arı poleni dışındaki gruplarda oral gavaj işleminin olası yan etkilerini elimine etmek amacıyla plasebo etkisi yaratacak bir madde ile diğer gruplara da oral gavaj işleminin yapılmamış olması şeklinde sıralanabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Sıçanlarda deneysel periodontitis modelinin başarılı bir şekilde oluşturulduğu,
2. Sıçanlarda arı poleninin oral gavaj yolu ile uygulamasının serum IL-4 ve serum IL-6 seviyelerine etkisinin olmadığı, diğer taraftan IL-4 seviyesini arttırdığı fakat bu sonucun istatistiksel anlamlı olmadığı,
3. Deneysel periodontitis modeli oluşturulan sıçanlarda sistemik arı poleni uygulamasının hematoksilen eozin boyalı kesitlerde inflamatuvar hücre yoğunluğunu azalttığı ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu,
4. Serum inflamatuvar sitokin seviyelerinin lokal sitokin seviyelerini yansıtmayabileceği bu sebeple periodontal hastalıkta sistemik anti-inflamatuvar uygulamasının bölgesel doku yıkımı üzerinde etkilerinin değerlendirilmesinde sadece serum değerlerinin değil doku seviyelerinin de değerlendirilmesi gerektiği,
5. İmmunohistokimyasal incelemede, sistemik arı poleni uygulamasının periodontal hastalıkta lokal doku yıkımının olduğu bölgelerde artan RANKL boyanma yoğunluğunu anlamlı derecede azalttığı,
6. OPG düzeylerinin immunohistokimyasal olarak boyanma yoğunluğunun arı poleni verilmesi ile anlamlı derecede yükseldiği, bu nedenle arı poleni uygulamasının alveoler kemik üzerinde yapım yıkım dengesini yapım yönünde etkileyebileceği

Sonuçları tespit edildi.

Bilgilerimiz dahilinde çalışmamız, DP oluşturulan sıçanlarda arı poleni uygulamasının inflamatuvar parametreler ve alveolar kemik yıkımı üzerine olan etkisini inceleyen ilk çalışmadır. Sistemik arı poleni uygulamasının periodontal

hastalığa bağlı inflamasyonu ve alveolar kemik kaybını azaltması sebebiyle, periodontal hastalıkta konak modülasyonunda yardımcı bir tedavi olarak kullanımı önerilebilir.



7. KAYNAKLAR

Bu tez çalışmasında Vancouver atıf sistemi kullanılmıştır.

1. Berezow AB, Darveau RP. Microbial shift and periodontitis. *Periodontology* 2000. 2011;55(1):36-47.
2. Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nature reviews Immunology*. 2015;15(1):30-44.
3. Sanz M, Marco Del Castillo A, Jepsen S, Gonzalez-Juanatey JR, D'Aiuto F, Bouchard P, et al. Periodontitis and cardiovascular diseases: Consensus report. *Journal of clinical periodontology*. 2020;47(3):268-88.
4. Bozkurt FY, Yetkin Ay Z, Berker E, Tepe E, Akkuş S. Anti-inflammatory cytokines in gingival crevicular fluid in patients with periodontitis and rheumatoid arthritis: a preliminary report. *Cytokine*. 2006;35(3-4):180-5.
5. Pan W, Wang Q, Chen Q. The cytokine network involved in the host immune response to periodontitis. *International journal of oral science*. 2019;11(3):30.
6. Yang B, Pang X, Li Z, Chen Z, Wang Y. Immunomodulation in the Treatment of Periodontitis: Progress and Perspectives. *Frontiers in immunology*. 2021;12:781378.
7. Kinane DF. Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontology* 2000. 2001;25:8-20.
8. Hienz SA, Paliwal S, Ivanovski S. Mechanisms of Bone Resorption in Periodontitis. *Journal of immunology research*. 2015;2015:615486.
9. Bartold PM, Narayanan AS. Molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissues. *Periodontology* 2000. 2006;40:29-49.
10. Taubman MA, Valverde P, Han X, Kawai T. Immune response: the key to bone resorption in periodontal disease. *J Periodontol*. 2005;76(11 Suppl):2033-41.
11. Udagawa N, Sato N, Yang S, Nakamura M, Yamashita T, Nakamura H, et al. Signal transduction of lipopolysaccharide-induced osteoclast differentiation. *Periodontology* 2000. 2007;43:56-64.
12. Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Host-mediated resolution of inflammation in periodontal diseases. *Periodontology* 2000. 2006;40:144-63.
13. Buduneli E, Vardar S, Buduneli N, Berdeli AH, Türkoğlu O, Başkesen A, et al. Effects of combined systemic administration of low-dose doxycycline and alendronate on endotoxin-induced periodontitis in rats. *J Periodontol*. 2004;75(11):1516-23.
14. de Sousa ET, de Araújo JSM, Pires AC, Lira Dos Santos EJ. Local delivery natural products to treat periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Clinical oral investigations*. 2021;25(7):4599-619.
15. Jagua-Gualdrón A, Peña-Latorre JA, Fernandez-Bernal RE. Apitherapy for Osteoarthritis: Perspectives from Basic Research. *Complementary medicine research*. 2020;27(3):184-92.
16. Kumar M, Prakash S, Radha, Lorenzo JM, Chandran D, Dhumal S, et al. Apitherapy and Periodontal Disease: Insights into In Vitro, In Vivo, and Clinical Studies. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*. 2022;11(5).
17. Eteraf-Oskouei T, Shafiee-Khamneh A, Heshmati-Afshar F, Delazar A. Anti-inflammatory and anti-angiogenesis effect of bee pollen methanolic extract using air pouch model of inflammation. *Research in pharmaceutical sciences*. 2020;15(1):66-75.
18. El-Seedi HR, Eid N, Abd El-Wahed AA, Rateb ME, Afifi HS, Algethami AF, et al. Honey Bee Products: Preclinical and Clinical Studies of Their Anti-inflammatory and Immunomodulatory Properties. *Frontiers in nutrition*. 2021;8:761267.
19. Lu LC, Chen YW, Chou CC. Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. *International journal of food microbiology*. 2005;102(2):213-20.

20. Uzel A, Sorkun K, Onçağ O, Cogulu D, Gençay O, Salih B. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiological research*. 2005;160(2):189-95.
21. Albandar JM, Rams TE. Global epidemiology of periodontal diseases: an overview. *Periodontology 2000*. 2002;29:7-10.
22. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *The Lancet*. 2005;366(9499):1809-20.
23. Mergenhagen SE, Dearaujo WC. ANTIBODY TO LEPTOTRICHIA BUCCALIS IN HUMAN SERA. *Archives of oral biology*. 1965;10:29-33.
24. Savage A, Eaton KA, Moles DR, Needleman I. A systematic review of definitions of periodontitis and methods that have been used to identify this disease. *Journal of clinical periodontology*. 2009;36(6):458-67.
25. Monti D, Ostan R, Borelli V, Castellani G, Franceschi C. Inflammaging and human longevity in the omics era. *Mechanisms of ageing and development*. 2017;165(Pt B):129-38.
26. Yucel-Lindberg T, Båge T. Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. *Expert reviews in molecular medicine*. 2013;15:e7.
27. Huang X, Xie M, Xie Y, Mei F, Lu X, Li X, et al. The roles of osteocytes in alveolar bone destruction in periodontitis. *Journal of translational medicine*. 2020;18(1):479.
28. Highfield J. Diagnosis and classification of periodontal disease. *Australian dental journal*. 2009;54 Suppl 1:S11-26.
29. Mehrotra N, Singh S. Periodontitis. *StatPearls*. Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Saurabh Singh declares no relevant financial relationships with ineligible companies.: StatPearls Publishing

Copyright © 2024, StatPearls Publishing LLC.; 2024.

30. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of clinical periodontology*. 1998;25(2):134-44.
31. Bartold PM, Van Dyke TE. Periodontitis: a host-mediated disruption of microbial homeostasis. *Unlearning learned concepts*. *Periodontology 2000*. 2013;62(1):203-17.
32. Liu YC, Lerner UH, Teng YT. Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles. *Periodontology 2000*. 2010;52(1):163-206.
33. Garlet GP. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *Journal of dental research*. 2010;89(12):1349-63.
34. Kim J, Amar S. Periodontal disease and systemic conditions: a bidirectional relationship. *Odontology*. 2006;94(1):10-21.
35. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, et al. 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 Suppl 1:S173-s82.
36. Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. *Nature reviews Disease primers*. 2017;3:17038.
37. Rabbani GM, Ash MM, Jr., Caffesse RG. The effectiveness of subgingival scaling and root planing in calculus removal. *J Periodontol*. 1981;52(3):119-23.
38. Stambaugh RV, Dragoo M, Smith DM, Carasali L. The limits of subgingival scaling. *The International journal of periodontics & restorative dentistry*. 1981;1(5):30-41.
39. Manresa C, Sanz-Miralles EC, Twigg J, Bravo M. Supportive periodontal therapy (SPT) for maintaining the dentition in adults treated for periodontitis. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2018;1(1):Cd009376.
40. Steffensen B, Webert HP. Relationship between the radiographic periodontal defect angle and healing after treatment. *J Periodontol*. 1989;60(5):248-54.
41. Papapanou PN, Wennström JL. The angular bony defect as indicator of further alveolar bone loss. *Journal of clinical periodontology*. 1991;18(5):317-22.
42. . !!! INVALID CITATION !!! {}.
43. Villar CC, Cochran DL. Regeneration of periodontal tissues: guided tissue regeneration. *Dental clinics of North America*. 2010;54(1):73-92.
44. Chavda S, Levin L. Human Studies of Vertical and Horizontal Alveolar Ridge Augmentation Comparing Different Types of Bone Graft Materials: A Systematic Review. *The Journal of oral implantology*. 2018;44(1):74-84.

45. Cortellini P, Pini Prato G, Tonetti MS. Periodontal regeneration of human infrabony defects. II. Re-entry procedures and bone measures. *J Periodontol.* 1993;64(4):261-8.
46. Cortellini P, Pini Prato G, Tonetti MS. Periodontal regeneration of human infrabony defects. I. Clinical measures. *J Periodontol.* 1993;64(4):254-60.
47. Tonetti MS, Pini Prato G, Williams RC, Cortellini P. Periodontal regeneration of human infrabony defects. III. Diagnostic strategies to detect bone gain. *J Periodontol.* 1993;64(4):269-77.
48. Tonetti MS, Pini-Prato G, Cortellini P. Periodontal regeneration of human intrabony defects. IV. Determinants of healing response. *J Periodontol.* 1993;64(10):934-40.
49. Koop R, Merheb J, Quirynen M. Periodontal regeneration with enamel matrix derivative in reconstructive periodontal therapy: a systematic review. *J Periodontol.* 2012;83(6):707-20.
50. Nevins M, Kim SW, Camelo M, Martin IS, Kim D, Nevins M. A prospective 9-month human clinical evaluation of Laser-Assisted New Attachment Procedure (LANAP) therapy. *The International journal of periodontics & restorative dentistry.* 2014;34(1):21-7.
51. Nevins ML, Camelo M, Schupbach P, Kim SW, Kim DM, Nevins M. Human clinical and histologic evaluation of laser-assisted new attachment procedure. *The International journal of periodontics & restorative dentistry.* 2012;32(5):497-507.
52. Preshaw PM. Host response modulation in periodontics. *Periodontology 2000.* 2008;48:92-110.
53. Paquette DW, Williams RC. Modulation of host inflammatory mediators as a treatment strategy for periodontal diseases. *Periodontology 2000.* 2000;24:239-52.
54. Salvi GE, Rocuzzo A, Imber JC, Stähli A, Klinge B, Lang NP. Clinical periodontal diagnosis. *Periodontology 2000.* 2023.
55. Dawson DR, 3rd, Branch-Mays G, Gonzalez OA, Ebersole JL. Dietary modulation of the inflammatory cascade. *Periodontology 2000.* 2014;64(1):161-97.
56. Costerton JW. Overview of microbial biofilms. *Journal of industrial microbiology.* 1995;15(3):137-40.
57. Hornef MW, Wick MJ, Rhen M, Normark S. Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. *Nature immunology.* 2002;3(11):1033-40.
58. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *Journal of clinical microbiology.* 2005;43(11):5721-32.
59. Nibali L, Fedele S, D'Aiuto F, Donos N. Interleukin-6 in oral diseases: a review. *Oral diseases.* 2012;18(3):236-43.
60. Bascones A, Noronha S, Gómez M, Mota P, González Moles MA, Villarroel Dorrego M. Tissue destruction in periodontitis: bacteria or cytokines fault? *Quintessence international (Berlin, Germany : 1985).* 2005;36(4):299-306.
61. Huang GT, Haake SK, Park NH. Gingival epithelial cells increase interleukin-8 secretion in response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* challenge. *J Periodontol.* 1998;69(10):1105-10.
62. Palmer RJ, Jr., Gordon SM, Cisar JO, Kolenbrander PE. Coaggregation-mediated interactions of streptococci and actinomyces detected in initial human dental plaque. *Journal of bacteriology.* 2003;185(11):3400-9.
63. Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in microbiology.* 2001;9(1):34-9.
64. Marsh PD, Moter A, Devine DA. Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. *Periodontology 2000.* 2011;55(1):16-35.
65. Murakami S, Mealey BL, Mariotti A, Chapple ILC. Dental plaque-induced gingival conditions. *J Periodontol.* 2018;89 Suppl 1:S17-s27.
66. Schroeder HE, Listgarten MA. The gingival tissues: the architecture of periodontal protection. *Periodontology 2000.* 1997;13:91-120.
67. Fredriksson M, Bergström K, Asman B. IL-8 and TNF-alpha from peripheral neutrophils and acute-phase proteins in periodontitis. *Journal of clinical periodontology.* 2002;29(2):123-8.
68. Bulkacz J, Carranza F. Defense Mechanisms of the Gingiva. 2012:344-54.
69. Lindhe J, Rylander H. Experimental gingivitis in young dogs. *Scandinavian journal of dental research.* 1975;83(6):314-26.
70. Payne WA, Page RC, Ogilvie AL, Hall WB. Histopathologic features of the initial and early stages of experimental gingivitis in man. *Journal of periodontal research.* 1975;10(2):51-64.

71. Schroeder HE. Quantitative parameters of early human gingival inflammation. *Archives of oral biology*. 1970;15(5):383-400.
72. Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1976;34(3):235-49.
73. Dale BA, Fredericks LP. Antimicrobial peptides in the oral environment: expression and function in health and disease. *Current issues in molecular biology*. 2005;7(2):119-33.
74. Dentino A, Lee S, Mailhot J, Hefti AF. Principles of periodontology. *Periodontology* 2000. 2013;61(1):16-53.
75. Manolagas SC, Jilka RL. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *The New England journal of medicine*. 1995;332(5):305-11.
76. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science (New York, NY)*. 2000;289(5484):1504-8.
77. Bartova J, Linhartova PB, Podzimek S, Janatova T, Svobodova K, Fassmann A, et al. The effect of IL-4 gene polymorphisms on cytokine production in patients with chronic periodontitis and in healthy controls. *Mediators of inflammation*. 2014;2014:185757.
78. Birkedal-Hansen H. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *Journal of periodontal research*. 1993;28(6 Pt 2):500-10.
79. Preshaw PM, Taylor JJ. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? *Journal of clinical periodontology*. 2011;38 Suppl 11:60-84.
80. Taylor JJ, Preshaw PM, Donaldson PT. Cytokine gene polymorphism and immunoregulation in periodontal disease. *Periodontology* 2000. 2004;35:158-82.
81. Deo V, Bhongade ML. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response. *Dentistry today*. 2010;29(9):60-2, 4-6; quiz 8-9.
82. Nikolopoulos GK, Dimou NL, Hamodrakas SJ, Bagos PG. Cytokine gene polymorphisms in periodontal disease: a meta-analysis of 53 studies including 4178 cases and 4590 controls. *Journal of clinical periodontology*. 2008;35(9):754-67.
83. Barksby HE, Lea SR, Preshaw PM, Taylor JJ. The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders. *Clinical and experimental immunology*. 2007;149(2):217-25.
84. Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists*. 1998;9(3):248-66.
85. 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* 2000. 1997;14:216-48.
86. Shirodaria S, Smith J, McKay IJ, Kennett CN, Hughes FJ. Polymorphisms in the IL-1A gene are correlated with levels of interleukin-1alpha protein in gingival crevicular fluid of teeth with severe periodontal disease. *Journal of dental research*. 2000;79(11):1864-9.
87. Galbraith GM, Hagan C, Steed RB, Sanders JJ, Javed T. Cytokine production by oral and peripheral blood neutrophils in adult periodontitis. *J Periodontol*. 1997;68(9):832-8.
88. Ishihara K, Hirano T. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine & growth factor reviews*. 2002;13(4-5):357-68.
89. Takahashi K, Takashiba S, Nagai A, Takigawa M, Myoukai F, Kurihara H, et al. Assessment of interleukin-6 in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol*. 1994;65(2):147-53.
90. McGee JM, Tucci MA, Edmundson TP, Serio CL, Johnson RB. The relationship between concentrations of proinflammatory cytokines within gingiva and the adjacent sulcular depth. *J Periodontol*. 1998;69(8):865-71.
91. Guillot JL, Pollock SM, Johnson RB. Gingival interleukin-6 concentration following phase I therapy. *J Periodontol*. 1995;66(8):667-72.
92. Jiang Y, Magli L, Russo M. Bacterium-dependent induction of cytokines in mononuclear cells and their pathologic consequences in vivo. *Infection and immunity*. 1999;67(5):2125-30.
93. Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol*. 2003;74(3):391-401.

94. Gravalles EM, Galson DL, Goldring SR, Auron PE. The role of TNF-receptor family members and other TRAF-dependent receptors in bone resorption. *Arthritis research*. 2001;3(1):6-12.
95. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest*. 2000;118(2):503-8.
96. Noack B, Genco RJ, Trevisan M, Grossi S, Zambon JJ, De Nardin E. Periodontal infections contribute to elevated systemic C-reactive protein level. *J Periodontol*. 2001;72(9):1221-7.
97. Loos BG, Craandijk J, Hoek FJ, Wertheim-van Dillen PM, van der Velden U. Elevation of systemic markers related to cardiovascular diseases in the peripheral blood of periodontitis patients. *J Periodontol*. 2000;71(10):1528-34.
98. Nussbaum G, Shapira L. How has neutrophil research improved our understanding of periodontal pathogenesis? *Journal of clinical periodontology*. 2011;38 Suppl 11:49-59.
99. Apolinário Vieira GH, Aparecida Rivas AC, Figueiredo Costa K, Ferreira Oliveira LF, Tanaka Suzuki K, Reis Messoria M, et al. Specific inhibition of IL-6 receptor attenuates inflammatory bone loss in experimental periodontitis. *J Periodontol*. 2021;92(10):1460-9.
100. Kudo O, Sabokbar A, Pocock A, Itonaga I, Fujikawa Y, Athanasou NA. Interleukin-6 and interleukin-11 support human osteoclast formation by a RANKL-independent mechanism. *Bone*. 2003;32(1):1-7.
101. Isola G, Lo Giudice A, Polizzi A, Alibrandi A, Murabito P, Indelicato F. Identification of the different salivary Interleukin-6 profiles in patients with periodontitis: A cross-sectional study. *Archives of oral biology*. 2021;122:104997.
102. Rudick CP, Lang MS, Miyamoto T. Understanding the pathophysiology behind chairside diagnostics and genetic testing for IL-1 and IL-6. *Oral diseases*. 2019;25(8):1879-85.
103. Taylor JJ. Cytokine regulation of immune responses to *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontology 2000*. 2010;54(1):160-94.
104. Balta MG, Papathanasiou E, Blix IJ, Van Dyke TE. Host Modulation and Treatment of Periodontal Disease. *Journal of dental research*. 2021;100(8):798-809.
105. Plachokova AS, Andreu-Sánchez S, Noz MP, Fu J, Riksen NP. Oral Microbiome in Relation to Periodontitis Severity and Systemic Inflammation. *International journal of molecular sciences*. 2021;22(11).
106. Iwashita M. Association between Periodontal Disease and Arteriosclerosis-Related Diseases. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. 2023;30(11):1517-24.
107. Sirin DA, Ozcelik F, Ersahan S, Pence HH. The importance of inflammatory biomarkers, IL-6 and PAPP-A, in the evaluation of asymptomatic apical periodontitis. *Odontology*. 2021;109(1):250-8.
108. Shyu KG, Choy CS, Wang DC, Huang WC, Chen SY, Chen CH, et al. Change of scaling-induced proinflammatory cytokine on the clinical efficacy of periodontitis treatment. *TheScientificWorldJournal*. 2015;2015:289647.
109. Wu KJ, Tu CC, Hu JX, Chu PH, Ma KS, Chiu HY, et al. Severity of periodontitis and salivary interleukin-1 β are associated with psoriasis involvement. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi*. 2022;121(10):1908-16.
110. Cardaropoli D, Cardaropoli G. Preservation of the postextraction alveolar ridge: a clinical and histologic study. *The International journal of periodontics & restorative dentistry*. 2008;28(5):469-77.
111. Onoe Y, Miyaoura C, Kaminakayashiki T, Nagai Y, Noguchi K, Chen QR, et al. IL-13 and IL-4 inhibit bone resorption by suppressing cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin synthesis in osteoblasts. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1996;156(2):758-64.
112. Bendixen AC, Shevde NK, Dienger KM, Willson TM, Funk CD, Pike JW. IL-4 inhibits osteoclast formation through a direct action on osteoclast precursors via peroxisome proliferator-activated receptor gamma 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(5):2443-8.
113. Reininger D, Cobo-Vázquez C, Monteserín-Matesanz M, López-Quiles J. Complications in the use of the mandibular body, ramus and symphysis as donor sites in bone graft surgery. A systematic review. *Medicina oral, patología oral y cirugía bucal*. 2016;21(2):e241-9.
114. Hendek MK, Erdemir E, editors. *Periodontal Hastalık ve Lipoksinler* 2012.
115. Yuan D, Zou Q, Yu T, Song C, Huang S, Chen S, et al. Ancestral genetic complexity of arachidonic acid metabolism in Metazoa. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1841(9):1272-84.

116. Zhou X, Li J, Yang W. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production by activating cAMP-response element-binding protein in rat peritoneal macrophages. *Immunology*. 2014;143(2):287-99.
117. Chilton FH, Murphy RC, Wilson BA, Sergeant S, Ainsworth H, Seeds MC, et al. Diet-gene interactions and PUFA metabolism: a potential contributor to health disparities and human diseases. *Nutrients*. 2014;6(5):1993-2022.
118. Listgarten MA. Pathogenesis of periodontitis. *Journal of clinical periodontology*. 1986;13(5):418-30.
119. Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science (New York, NY)*. 2001;294(5548):1871-5.
120. Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps RP. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends in immunology*. 2002;23(3):144-50.
121. Bergström S. Prostaglandins: members of a new hormonal system. These physiologically very potent compounds of ubiquitous occurrence are formed from essential fatty acids. *Science (New York, NY)*. 1967;157(3787):382-91.
122. Samuelsson B, Granström E, Green K, Hamberg M, Hammarström S. Prostaglandins. *Annual review of biochemistry*. 1975;44:669-95.
123. Granström E. The arachidonic acid cascade. The prostaglandins, thromboxanes and leukotrienes. *Inflammation*. 1984;8 Suppl:S15-25.
124. Hikiji H, Takato T, Shimizu T, Ishii S. The roles of prostanoids, leukotrienes, and platelet-activating factor in bone metabolism and disease. *Progress in lipid research*. 2008;47(2):107-26.
125. Noguchi K, Ishikawa I. The roles of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 in periodontal disease. *Periodontology 2000*. 2007;43:85-101.
126. Flavell SJ, Hou TZ, Lax S, Filer AD, Salmon M, Buckley CD. Fibroblasts as novel therapeutic targets in chronic inflammation. *British journal of pharmacology*. 2008;153 Suppl 1(Suppl 1):S241-6.
127. Kaneko H, Mehrotra M, Alander C, Lerner U, Pilbeam C, Raisz L. Effects of prostaglandin E2 and lipopolysaccharide on osteoclastogenesis in RAW 264.7 cells. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*. 2007;77(3-4):181-6.
128. Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjäderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta odontologica Scandinavica*. 2007;65(1):1-13.
129. Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol*. 1993;64(5 Suppl):474-84.
130. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation research*. 2003;92(8):827-39.
131. Chen Z, Lang G, Xu X, Liang X, Han Y, Han Y. The role of NF-kappaB in the inflammatory processes related to dental caries, pulpitis, apical periodontitis, and periodontitis-a narrative review. *PeerJ*. 2024;12:e17953.
132. Alexander MB, Damoulis PD. The role of cytokines in the pathogenesis of periodontal disease. *Current opinion in periodontology*. 1994:39-53.
133. Tervahartiala T, Piriä E, Ceponis A, Maisi P, Salo T, Tuter G, et al. 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. *Journal of dental research*. 2000;79(12):1969-77.
134. Choi DH, Moon IS, Choi BK, Paik JW, Kim YS, Choi SH, et al. Effects of sub-antimicrobial dose doxycycline therapy on crevicular fluid MMP-8, and gingival tissue MMP-9, TIMP-1 and IL-6 levels in chronic periodontitis. *Journal of periodontal research*. 2004;39(1):20-6.
135. Beklen A, Tüter G, Sorsa T, Hanemaaijer R, Virtanen I, Tervahartiala T, et al. Gingival tissue and crevicular fluid co-operation in adult periodontitis. *Journal of dental research*. 2006;85(1):59-63.
136. Marcaccini AM, Meschiari CA, Zuairi LR, de Sousa TS, Taba M, Jr., Teofilo JM, et al. Gingival crevicular fluid levels of MMP-8, MMP-9, TIMP-2, and MPO decrease after periodontal therapy. *Journal of clinical periodontology*. 2010;37(2):180-90.
137. Kraft-Neumärker M, Lorenz K, Koch R, Hoffmann T, Mäntylä P, Sorsa T, et al. Full-mouth profile of active MMP-8 in periodontitis patients. *Journal of periodontal research*. 2012;47(1):121-8.
138. Di Benedetto A, Gigante I, Colucci S, Grano M. Periodontal disease: linking the primary inflammation to bone loss. *Clinical & developmental immunology*. 2013;2013:503754.

139. Cochran DL. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J Periodontol.* 2008;79(8 Suppl):1569-76.
140. Waerhaug J. The angular bone defect and its relationship to trauma from occlusion and downgrowth of subgingival plaque. *Journal of clinical periodontology.* 1979;6(2):61-82.
141. Page RC, Schroeder HE. Current status of the host response in chronic marginal periodontitis. *J Periodontol.* 1981;52(9):477-91.
142. Nevins M, Mellonig JT. Enhancement of the damaged edentulous ridge to receive dental implants: a combination of allograft and the GORE-TEX membrane. *The International journal of periodontics & restorative dentistry.* 1992;12(2):96-111.
143. Teitelbaum SL. Osteoclasts: what do they do and how do they do it? *The American journal of pathology.* 2007;170(2):427-35.
144. Bar-Shavit Z. The osteoclast: a multinucleated, hematopoietic-origin, bone-resorbing osteoimmune cell. *Journal of cellular biochemistry.* 2007;102(5):1130-9.
145. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1998;95(7):3597-602.
146. Bruzzaniti A, Baron R. Molecular regulation of osteoclast activity. *Reviews in endocrine & metabolic disorders.* 2006;7(1-2):123-39.
147. Saffar JL, Lasfargues JJ, Cherruau M. Alveolar bone and the alveolar process: the socket that is never stable. *Periodontology 2000.* 1997;13:76-90.
148. Nanci A, Bosshardt DD. Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontology 2000.* 2006;40:11-28.
149. Wiebe SH, Hafezi M, Sandhu HS, Sims SM, Dixon SJ. Osteoclast activation in inflammatory periodontal diseases. *Oral diseases.* 1996;2(2):167-80.
150. Baron R. Molecular mechanisms of bone resorption. An update. *Acta orthopaedica Scandinavica Supplementum.* 1995;266:66-70.
151. Schwartz Z, Goultschin J, Dean DD, Boyan BD. Mechanisms of alveolar bone destruction in periodontitis. *Periodontology 2000.* 1997;14:158-72.
152. Giannobile WV, Al-Shammari KF, Sarment DP. Matrix molecules and growth factors as indicators of periodontal disease activity. *Periodontology 2000.* 2003;31:125-34.
153. Chambers TJ. The pathobiology of the osteoclast. *Journal of clinical pathology.* 1985;38(3):241-52.
154. Oates TW, Cochran DL. Bone cell interactions and regulation by inflammatory mediators. *Current opinion in periodontology.* 1996;3:34-44.
155. Zou W, Bar-Shavit Z. Dual modulation of osteoclast differentiation by lipopolysaccharide. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research.* 2002;17(7):1211-8.
156. MacDonald BR. Parathyroid hormone, prostaglandins and bone resorption. *World review of nutrition and dietetics.* 1986;47:163-201.
157. Liu D, Xu JK, Figliomeni L, Huang L, Pavlos NJ, Rogers M, et al. Expression of RANKL and OPG mRNA in periodontal disease: possible involvement in bone destruction. *International journal of molecular medicine.* 2003;11(1):17-21.
158. McCauley LK, Nohutcu RM. Mediators of periodontal osseous destruction and remodeling: principles and implications for diagnosis and therapy. *J Periodontol.* 2002;73(11):1377-91.
159. Trouvin AP, Goëb V. Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin: maintaining the balance to prevent bone loss. *Clinical interventions in aging.* 2010;5:345-54.
160. Takayanagi H. The role of NFAT in osteoclast formation. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2007;1116:227-37.
161. Nagasawa T, Kiji M, Yashiro R, Hormdee D, Lu H, Kunze M, et al. Roles of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin in periodontal health and disease. *Periodontology 2000.* 2007;43:65-84.
162. Parfitt AM. The coupling of bone formation to bone resorption: a critical analysis of the concept and of its relevance to the pathogenesis of osteoporosis. *Metabolic bone disease & related research.* 1982;4(1):1-6.
163. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *Journal*

of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research. 2000;15(1):2-12.

164. Jin Q, Cirelli JA, Park CH, Sugai JV, Taba M, Jr., Kostenuik PJ, et al. RANKL inhibition through osteoprotegerin blocks bone loss in experimental periodontitis. *J Periodontol*. 2007;78(7):1300-8.

165. Kawai T, Matsuyama T, Hosokawa Y, Makihiro S, Seki M, Karimbux NY, et al. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *The American journal of pathology*. 2006;169(3):987-98.

166. Han X, Kawai T, Taubman MA. Interference with immune-cell-mediated bone resorption in periodontal disease. *Periodontology 2000*. 2007;45:76-94.

167. Gruber R. Cell biology of osteoimmunology. *Wiener medizinische Wochenschrift* (1946). 2010;160(17-18):438-45.

168. Ohlrich EJ, Cullinan MP, Seymour GJ. The immunopathogenesis of periodontal disease. *Australian dental journal*. 2009;54 Suppl 1:S2-10.

169. Lerner UH. Inflammation-induced bone remodeling in periodontal disease and the influence of post-menopausal osteoporosis. *Journal of dental research*. 2006;85(7):596-607.

170. Belibasakis GN, Bostanci N. The RANKL-OPG system in clinical periodontology. *Journal of clinical periodontology*. 2012;39(3):239-48.

171. Lin X, Han X, Kawai T, Taubman MA. Antibody to receptor activator of NF- κ B ligand ameliorates T cell-mediated periodontal bone resorption. *Infection and immunity*. 2011;79(2):911-7.

172. Hajishengallis G, Chavakis T, Lambris JD. Current understanding of periodontal disease pathogenesis and targets for host-modulation therapy. *Periodontology 2000*. 2020;84(1):14-34.

173. Van Dyke TE, Bartold PM, Reynolds EC. The Nexus Between Periodontal Inflammation and Dysbiosis. *Frontiers in immunology*. 2020;11:511.

174. Preshaw PM. Host modulation therapy with anti-inflammatory agents. *Periodontology 2000*. 2018;76(1):131-49.

175. Giannobile WV. Host-response therapeutics for periodontal diseases. *J Periodontol*. 2008;79(8 Suppl):1592-600.

176. Novak MJ, Johns LP, Miller RC, Bradshaw MH. Adjunctive benefits of subantimicrobial dose doxycycline in the management of severe, generalized, chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2002;73(7):762-9.

177. Oringer RJ. Modulation of the host response in periodontal therapy. *J Periodontol*. 2002;73(4):460-70.

178. Caton J, Ryan ME. Clinical studies on the management of periodontal diseases utilizing subantimicrobial dose doxycycline (SDD). *Pharmacological research*. 2011;63(2):114-20.

179. Golub LM, Lee HM, Ryan ME, Giannobile WV, Payne J, Sorsa T. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-antimicrobial mechanisms. *Advances in dental research*. 1998;12(2):12-26.

180. Preshaw PM, Novak MJ, Mellonig J, Magnusson I, Polson A, Giannobile WV, et al. Modified-release subantimicrobial dose doxycycline enhances scaling and root planing in subjects with periodontal disease. *J Periodontol*. 2008;79(3):440-52.

181. Preshaw PM, Hefti AF, Jepsen S, Etienne D, Walker C, Bradshaw MH. Subantimicrobial dose doxycycline as adjunctive treatment for periodontitis. A review. *Journal of clinical periodontology*. 2004;31(9):697-707.

182. Caton JG, Ciancio SG, Blieden TM, Bradshaw M, Crout RJ, Hefti AF, et al. Treatment with subantimicrobial dose doxycycline improves the efficacy of scaling and root planing in patients with adult periodontitis. *J Periodontol*. 2000;71(4):521-32.

183. Nyman S, Schroeder HE, Lindhe J. Suppression of inflammation and bone resorption by indomethacin during experimental periodontitis in dogs. *J Periodontol*. 1979;50(9):450-61.

184. Williams RC, Jeffcoat MK, Howell TH, Hall CM, Johnson HG, Wechter WJ, et al. Indomethacin or flurbiprofen treatment of periodontitis in beagles: comparison of effect on bone loss. *Journal of periodontal research*. 1987;22(5):403-7.

185. Howell TH, Jeffcoat MK, Goldhaber P, Reddy MS, Kaplan ML, Johnson HG, et al. Inhibition of alveolar bone loss in beagles with the NSAID naproxen. *Journal of periodontal research*. 1991;26(6):498-501.

186. Howell TH, Fiorellini J, Weber HP, Williams RC. Effect of the NSAID piroxicam, topically administered, on the development of gingivitis in beagle dogs. *Journal of periodontal research*. 1991;26(3 Pt 1):180-3.
187. Williams RC, Jeffcoat MK, Howell TH, Reddy MS, Johnson HG, Hall CM, et al. Ibuprofen: an inhibitor of alveolar bone resorption in beagles. *Journal of periodontal research*. 1988;23(4):225-9.
188. Fleisch H. Bisphosphonates. Pharmacology and use in the treatment of tumour-induced hypercalcaemic and metastatic bone disease. *Drugs*. 1991;42(6):919-44.
189. Reddy MS, Geurs NC, Gunsolley JC. Periodontal host modulation with antiproteinase, anti-inflammatory, and bone-sparing agents. A systematic review. *Annals of periodontology*. 2003;8(1):12-37.
190. Rocha M, Nava LE, Vázquez de la Torre C, Sánchez-Márin F, Garay-Sevilla ME, Malacara JM. Clinical and radiological improvement of periodontal disease in patients with type 2 diabetes mellitus treated with alendronate: a randomized, placebo-controlled trial. *J Periodontol*. 2001;72(2):204-9.
191. Lane N, Armitage GC, Loomer P, Hsieh S, Majumdar S, Wang HY, et al. Bisphosphonate therapy improves the outcome of conventional periodontal treatment: results of a 12-month, randomized, placebo-controlled study. *J Periodontol*. 2005;76(7):1113-22.
192. Wong HL, Costa GL, Lotze MT, Wahl SM. Interleukin (IL) 4 differentially regulates monocyte IL-1 family gene expression and synthesis in vitro and in vivo. *The Journal of experimental medicine*. 1993;177(3):775-81.
193. Allen JB, Wong HL, Costa GL, Bienkowski MJ, Wahl SM. Suppression of monocyte function and differential regulation of IL-1 and IL-1ra by IL-4 contribute to resolution of experimental arthritis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1993;151(8):4344-51.
194. Suez J, Zmora N, Segal E, Elinav E. The pros, cons, and many unknowns of probiotics. *Nature medicine*. 2019;25(5):716-29.
195. Montero E, Iniesta M, Rodrigo M, Marín MJ, Figuero E, Herrera D, et al. Clinical and microbiological effects of the adjunctive use of probiotics in the treatment of gingivitis: A randomized controlled clinical trial. *Journal of clinical periodontology*. 2017;44(7):708-16.
196. Lu EM. The role of vitamin D in periodontal health and disease. *Journal of periodontal research*. 2023;58(2):213-24.
197. Weaver CM, Peacock M. Calcium. *Advances in nutrition (Bethesda, Md)*. 2019;10(3):546-8.
198. Samarghandian S, Farkhondeh T, Samini F. Honey and Health: A Review of Recent Clinical Research. *Pharmacognosy research*. 2017;9(2):121-7.
199. Sforcin JM. Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis. *Phytotherapy research : PTR*. 2016;30(6):894-905.
200. Cornara L, Biagi M, Xiao J, Burlando B. Therapeutic Properties of Bioactive Compounds from Different Honeybee Products. *Frontiers in pharmacology*. 2017;8:412.
201. Eteraf-Oskouei T, Allahyari S, Akbarzadeh-Atashkhosrow A, Delazar A, Pashaii M, Gan SH, et al. Methanolic Extract of *Ficus carica* Linn. Leaves Exerts Antiangiogenesis Effects Based on the Rat Air Pouch Model of Inflammation. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*. 2015;2015:760405.
202. Feres M, Figueiredo LC, Barreto IM, Coelho MH, Araujo MW, Cortelli SC. In vitro antimicrobial activity of plant extracts and propolis in saliva samples of healthy and periodontally-involved subjects. *Journal of the International Academy of Periodontology*. 2005;7(3):90-6.
203. Kalemba D, Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current medicinal chemistry*. 2003;10(10):813-29.
204. Banskota AH, Tezuka Y, Kadota S. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytotherapy research : PTR*. 2001;15(7):561-71.
205. Okamoto I, Taniguchi Y, Kunikata T, Kohno K, Iwaki K, Ikeda M, et al. Major royal jelly protein 3 modulates immune responses in vitro and in vivo. *Life sciences*. 2003;73(16):2029-45.
206. Stepanović S, Antić N, Dakić I, Svabić-Vlahović M. In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. *Microbiological research*. 2003;158(4):353-7.
207. Duarte S, Koo H, Bowen WH, Hayacibara MF, Cury JA, Ikegaki M, et al. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2003;26(4):527-31.

208. Santos FA, Bastos EM, Maia AB, Uzeda M, Carvalho MA, Farias LM, et al. Brazilian propolis: physicochemical properties, plant origin and antibacterial activity on periodontopathogens. *Phytotherapy research* : PTR. 2003;17(3):285-9.
209. Ledón N, Casacó A, González R, Merino N, González A, Tolón Z. Antipsoriatic, anti-inflammatory, and analgesic effects of an extract of red propolis. *Zhongguo yao li xue bao = Acta pharmacologica Sinica*. 1997;18(3):274-6.
210. Kosedag M, Gulaboglu M. Pollen and bee bread expressed highest anti-inflammatory activities among bee products in chronic inflammation: an experimental study with cotton pellet granuloma in rats. *Inflammopharmacology*. 2023;31(4):1967-75.
211. Rao PV, Krishnan KT, Salleh N, Gan SH. Biological and therapeutic effects of honey produced by honey bees and stingless bees: a comparative review. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2016;26:657-64.
212. Almeida-Muradian LBd, Pamplona LC, Coimbra SI, Barth OM. Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. *Journal of food composition and analysis*. 2005;18(1):105-11.
213. Stanciu OG, Mărghițaș LA, Dezmirean D. Macro-and Oligo-Mineral Elements from Honeybee-Collected Pollen and Beebread Harvested from Transylvania (Romania). *Bulletin of the University of Agricultural Sciences & Veterinary Medicine Cluj-Napoca Animal Science & Biotechnologies*. 2009;66.
214. Shoshtari MS, Majd A, Taba MAA, Larijani K, Kazemi M. Chemical composition of the essential oils from leaves, flowers and pollen grains of *Chrysanthemum maximum* Ramond. of different flowering stages. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2012;15(1):157-63.
215. Moreira L, Dias LG, Pereira JA, Estevinho L. Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food and Chemical toxicology*. 2008;46(11):3482-5.
216. Pascoal A, Rodrigues S, Teixeira A, Feás X, Estevinho LM. Biological activities of commercial bee pollens: antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2014;63:233-9.
217. Denisow B, Denisow-Pietrzyk M. Biological and therapeutic properties of bee pollen: a review. *Journal of the science of food and agriculture*. 2016;96(13):4303-9.
218. Koval V, Tykhonov O, Shpychak O. Study of specific pharmacological activity of standardized composition of bee product substances for treatment of urogenital system. 2017.
219. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2002;13(10):572-84.
220. Hollman PCH, Katan MB. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food and chemical toxicology*. 1999;37(9-10):937-42.
221. Kieliszek M, Piwowarek K, Kot AM, Błażej S, Chlebowska-Śmigiel A, Wolska I. Pollen and bee bread as new health-oriented products: A review. *Trends in Food Science & Technology*. 2018;71:170-80.
222. Dudov I, Morenets A, Artiukh V, Starodub N. Immunomodulatory effect of honeybee flower pollen load. *Ukrainskii Biokhimicheskii Zhurnal* (1978). 1994;66(6):91-3.
223. Qin F, Sun H-X. Immunosuppressive activity of Pollen *Typhae* ethanol extract on the immune responses in mice. *Journal of ethnopharmacology*. 2005;102(3):424-9.
224. Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews*. 2000;52(4):673-751.
225. Han X, Shen T, Lou H. Dietary polyphenols and their biological significance. *International journal of molecular sciences*. 2007;8(9):950-88.
226. Maruyama H, Sakamoto T, Araki Y, Hara H. Anti-inflammatory effect of bee pollen ethanol extract from *Cistus* sp. of Spanish on carrageenan-induced rat hind paw edema. *BMC complementary and alternative medicine*. 2010;10:30.
227. Shoskes DA, Manickam K. Herbal and complementary medicine in chronic prostatitis. *World Journal of Urology*. 2003;21:109-13.
228. Devi KP, Malar DS, Nabavi SF, Sureda A, Xiao J, Nabavi SM, et al. Kaempferol and inflammation: From chemistry to medicine. *Pharmacological research*. 2015;99:1-10.

229. Rzepecka-Stojko A, Stojko J, Kurek-Górecka A, Górecki M, Kabała-Dzik A, Kubina R, et al. Polyphenols from bee pollen: structure, absorption, metabolism and biological activity. *Molecules*. 2015;20(12):21732-49.
230. Rice-evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, Bramley PM, Pridham JB. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free radical research*. 1995;22(4):375-83.
231. Guardia T, Rotelli AE, Juarez AO, Pelzer LE. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Il farmaco*. 2001;56(9):683-7.
232. Sato M, Miyazaki T, Kambe F, Maeda K, Seo H. Quercetin, a bioflavonoid, inhibits the induction of interleukin 8 and monocyte chemoattractant protein-1 expression by tumor necrosis factor-alpha in cultured human synovial cells. *The Journal of rheumatology*. 1997;24(9):1680-4.
233. Almaraz-Abarca N, da Graça Campos M, Avila-Reyes JA, Naranjo-Jimenez N, Corral JH, Gonzalez-Valdez LS. Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral honeybee-collected pollen from mesquite (*Prosopis juliflora*, Leguminosae). *Journal of Food Composition and Analysis*. 2007;20(2):119-24.
234. Ferreira JF, Luthria DL, Sasaki T, Heyerick A. Flavonoids from *Artemisia annua* L. as antioxidants and their potential synergism with artemisinin against malaria and cancer. *Molecules*. 2010;15(5):3135-70.
235. Cook NC, Samman S. Flavonoids—chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *The Journal of nutritional biochemistry*. 1996;7(2):66-76.
236. Arivarasu N, Priyamvada S, Mahmood R. Oral administration of caffeic acid ameliorates the effect of cisplatin on brush border membrane enzymes and antioxidant system in rat intestine. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 2013;65(1-2):21-5.
237. Derochette S, Franck T, Mouithys-Mickalad A, Deby-Dupont G, Neven P, Serteyn D. Intra- and extracellular antioxidant capacities of the new water-soluble form of curcumin (NDS27) on stimulated neutrophils and HL-60 cells. *Chemico-biological interactions*. 2013;201(1-3):49-57.
238. Martinello M, Mutinelli F. Antioxidant Activity in Bee Products: A Review. *Antioxidants* (Basel, Switzerland). 2021;10(1).
239. Bindu S, Mazumder S, Bandyopadhyay U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. *Biochemical pharmacology*. 2020;180:114147.
240. Li LS, Chiroma SM, Hashim T, Adam SK, Moklas MAM, Yusuf Z, et al. Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Erythroxylum cuneatum* alkaloid leaf extract. *Heliyon*. 2020;6(6).
241. Medeiros K, Figueiredo C, Figueiredo T, Freire K, Santos F, Alcântara-Neves NM, et al. Anti-allergic effect of bee pollen phenolic extract and myricetin in ovalbumin-sensitized mice. *Journal of ethnopharmacology*. 2008;119(1):41-6.
242. Jannesar M, Majd A, Shoushtari MS, Oraei M. Effect of total flavonoid extract of *Tanacetum parthenium* L.(feverfew) pollen grains on immune system responses in Balb/C mice. 2014.
243. Freire KR, Lins AC, Dórea MC, Santos FA, Camara CA, Silva TM. Palynological origin, phenolic content, and antioxidant properties of honeybee-collected pollen from Bahia, Brazil. *Molecules*. 2012;17(2):1652-64.
244. Graikou K, Kapeta S, Aligiannis N, Sotiroudis G, Chondrogianni N, Gonos E, et al. Chemical analysis of Greek pollen-Antioxidant, antimicrobial and proteasome activation properties. *Chemistry Central Journal*. 2011;5:1-9.
245. Moita E, Gil-Izquierdo A, Sousa C, Ferreres F, Silva LR, Valentao P, et al. Integrated analysis of COX-2 and iNOS derived inflammatory mediators in LPS-stimulated RAW macrophages pre-exposed to *Echium plantagineum* L. bee pollen extract. *PloS one*. 2013;8(3):e59131.
246. Grauballe MC, Bentzen BH, Björnsson M, Moe D, Jonassen TE, Bendtzen K, et al. The effect of spironolactone on experimental periodontitis in rats. *Journal of periodontal research*. 2005;40(3):212-7.
247. Weinberg MA, Bral M. Laboratory animal models in periodontology. *Journal of clinical periodontology*. 1999;26(6):335-40.
248. Oz HS, Puleo DA. Animal models for periodontal disease. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2011;2011:754857.
249. Taubman MA, Yoshie H, Wetherell JR, Jr., Ebersole JL, Smith DJ. Immune response and periodontal bone loss in germfree rats immunized and infected with *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Journal of periodontal research*. 1983;18(4):393-401.
250. Zulhendri F, Lesmana R, Tandean S, Christopher A, Chandrasekaran K, Irsyam I, et al. Recent Update on the Anti-Inflammatory Activities of Propolis. *Molecules*. 2022;27(23).

251. Li Q, Sun M, Wan Z, Liang J, Betti M, Hrynets Y, et al. Bee Pollen Extracts Modulate Serum Metabolism in Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury Mice with Anti-Inflammatory Effects. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2019;67(28):7855-68.
252. Rogers JE, Li F, Coatney DD, Rossa C, Bronson P, Krieder JM, et al. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide-mediated experimental bone loss model for aggressive periodontitis. *J Periodontol*. 2007;78(3):550-8.
253. Bain JL, Lester SR, Henry WD, Bishop CM, Turnage AA, Naftel JP, et al. Comparative gender differences in local and systemic concentrations of pro-inflammatory cytokines in rats with experimental periodontitis. *Journal of periodontal research*. 2009;44(1):133-40.
254. Higuchi T, Kinoshita A, Takahashi K, Oda S, Ishikawa I. Bone regeneration by recombinant human bone morphogenetic protein-2 in rat mandibular defects. An experimental model of defect filling. *J Periodontol*. 1999;70(9):1026-31.
255. Polak D, Wilensky A, Shapira L, Halabi A, Goldstein D, Weiss EI, et al. Mouse model of experimental periodontitis induced by *Porphyromonas gingivalis*/*Fusobacterium nucleatum* infection: bone loss and host response. *Journal of clinical periodontology*. 2009;36(5):406-10.
256. Kuhr A, Popa-Wagner A, Schmoll H, Schwahn C, Kocher T. Observations on experimental marginal periodontitis in rats. *Journal of periodontal research*. 2004;39(2):101-6.
257. de Molon RS, Park CH, Jin Q, Sugai J, Cirelli JA. Characterization of ligature-induced experimental periodontitis. *Microscopy research and technique*. 2018;81(12):1412-21.
258. Toker H, Ozan F, Ozer H, Ozdemir H, Eren K, Yeler H. A morphometric and histopathologic evaluation of the effects of propolis on alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol*. 2008;79(6):1089-94.
259. Kuo TY, Hsieh MC, Cheng CD, Huang RY, Van Dyke TE, Sung CE, et al. Chlorhexidine gel topical application ameliorates inflammatory bone loss in experimental periodontitis. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi*. 2023;122(9):899-910.
260. Yağan A, Kesim S, Liman N. Effect of low-dose doxycycline on serum oxidative status, gingival antioxidant levels, and alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol*. 2014;85(3):478-89.
261. Tomofuji T, Ekuni D, Irie K, Azuma T, Endo Y, Tamaki N, et al. Preventive effects of a cocoa-enriched diet on gingival oxidative stress in experimental periodontitis. *J Periodontol*. 2009;80(11):1799-808.
262. Konečná B, Chobodová P, Janko J, Baňasová L, Bábíčková J, Celec P, et al. The Effect of Melatonin on Periodontitis. *International journal of molecular sciences*. 2021;22(5).
263. Chipashvili O, Bor B. Ligature-induced periodontitis mouse model protocol for studying *Saccharibacteria*. *STAR protocols*. 2022;3(1):101167.
264. Chumakova Y, Vishnevskaya A, Kakabadze A, Karalashvili L, Kakabadze Z. [Clinical and biochemical analysis of ligature-induced periodontitis in rats]. *Georgian medical news*. 2014(235):63-9.
265. Sağlam M, Köseoğlu S, Hatipoğlu M, Esen HH, Köksal E. Effect of sumac extract on serum oxidative status, RANKL/OPG system and alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *Journal of applied oral science : revista FOB*. 2015;23(1):33-41.
266. Semenoff TA, Semenoff-Segundo A, Bosco AF, Nagata MJ, Garcia VG, Biasoli ER. Histometric analysis of ligature-induced periodontitis in rats: a comparison of histological section planes. *Journal of applied oral science : revista FOB*. 2008;16(4):251-6.
267. Carvalho Rde S, de Souza CM, Neves JC, Holanda-Pinto SA, Pinto LM, Brito GA, et al. Vitamin E does not prevent bone loss and induced anxiety in rats with ligature-induced periodontitis. *Archives of oral biology*. 2013;58(1):50-8.
268. Di Paola R, Mazzon E, Rotondo F, Dattola F, Britti D, De Majo M, et al. Reduced development of experimental periodontitis by treatment with M40403, a superoxide dismutase mimetic. *European journal of pharmacology*. 2005;516(2):151-7.
269. Toker H, Ozdemir H, Balci H, Ozer H. N-acetylcysteine decreases alveolar bone loss on experimental periodontitis in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of periodontal research*. 2012;47(6):793-9.
270. Bezerra MM, de Lima V, Alencar VB, Vieira IB, Brito GA, Ribeiro RA, et al. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol*. 2000;71(6):1009-14.

271. Goes P, Lima NA, Rodrigues JA, Benevides NM, Brito GA, Lima V. Anti-inflammatory and Anti-resorptive Effects of Atorvastatin on Alveolar Bone Loss in Wistar Rats. *Brazilian dental journal*. 2016;27(3):267-72.
272. Shahrzad S, Bitsch I. Determination of some pharmacologically active phenolic acids in juices by high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography A*. 1996;741(2):223-31.
273. Zhu L, Li J, Wei C, Luo T, Deng Z, Fan Y, et al. A polysaccharide from *Fagopyrum esculentum* Moench bee pollen alleviates microbiota dysbiosis to improve intestinal barrier function in antibiotic-treated mice. *Food & function*. 2020;11(12):10519-33.
274. Attia YA, Al-Hanoun A, El-Din AE, Bovera F, Shewika YE. Effect of bee pollen levels on productive, reproductive and blood traits of NZW rabbits. *Journal of animal physiology and animal nutrition*. 2011;95(3):294-303.
275. Attia YA, El-Hanoun AM, Bovera F, Monastra G, El-Tahawy WS, Habiba HI. Growth performance, carcass quality, biochemical and haematological traits and immune response of growing rabbits as affected by different growth promoters. *Journal of animal physiology and animal nutrition*. 2014;98(1):128-39.
276. Shaldoum F, El-Kott AF, Ouda MMA, Abd-Ella EM. Immunomodulatory effects of bee pollen on doxorubicin-induced bone marrow/spleen immunosuppression in rat. *Journal of food biochemistry*. 2021;45(6):e13747.
277. Mohamed NA, Ahmed OM, Hozayen WG, Ahmed MA. Ameliorative effects of bee pollen and date palm pollen on the glycemic state and male sexual dysfunctions in streptozotocin-Induced diabetic wistar rats. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2018;97:9-18.
278. Madianos PN, Bobetsis YA, Kinane DF. Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingiva. *Journal of clinical periodontology*. 2005;32 Suppl 6:57-71.
279. Marcaccini AM, Meschiari CA, Sorgi CA, Saraiva MC, de Souza AM, Faccioli LH, et al. Circulating interleukin-6 and high-sensitivity C-reactive protein decrease after periodontal therapy in otherwise healthy subjects. *J Periodontol*. 2009;80(4):594-602.
280. Qing H, Desrouleaux R, Israni-Winger K, Mineur YS, Fogelman N, Zhang C, et al. Origin and Function of Stress-Induced IL-6 in Murine Models. *Cell*. 2020;182(2):372-87.e14.
281. LeMay LG, Vander AJ, Kluger MJ. The effects of psychological stress on plasma interleukin-6 activity in rats. *Physiology & behavior*. 1990;47(5):957-61.
282. Brown AP, Dinger N, Levine BS. Stress produced by gavage administration in the rat. *Contemporary topics in laboratory animal science*. 2000;39(1):17-21.
283. Guzman S, Karima M, Wang HY, Van Dyke TE. Association between interleukin-1 genotype and periodontal disease in a diabetic population. *J Periodontol*. 2003;74(8):1183-90.
284. Lima Teixeira JF, Henning P, Cintra Magalhães FA, Coletto-Nunes G, Floriano-Marcelino T, Westerlund A, et al. Osteoprotective effect by interleukin-4 (IL-4) on lipoprotein-induced periodontitis. *Cytokine*. 2023;172:156399.
285. Robati M, Ranjbari A, Ghafourian Boroujerdnia M, Chinipardaz Z. Detection of IL-4, IL-6 and IL-12 serum levels in generalized aggressive periodontitis. *Iranian journal of immunology : IJI*. 2011;8(3):170-5.
286. Acharya AB, Thakur S, Muddapur MV, Kulkarni RD. Tumor necrosis factor- α , interleukin-4 and -6 in the serum of health, chronic periodontitis, and type 2 diabetes mellitus. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 2016;20(5):509-13.
287. te Velde AA, Huijbens RJ, Heije K, de Vries JE, Figdor CG. Interleukin-4 (IL-4) inhibits secretion of IL-1 beta, tumor necrosis factor alpha, and IL-6 by human monocytes. *Blood*. 1990;76(7):1392-7.
288. Rabelo MS, Gomes GH, Foz AM, Stadler AF, Cutler CW, Susin C, et al. Short-term effect of non-surgical periodontal treatment on local and systemic cytokine levels: Role of hyperglycemia. *Cytokine*. 2021;138:155360.
289. Bedini R, Meleo D, Pecci R, Pacifici L. The use of microtomography in bone tissue and biomaterial three-dimensional analysis. *Annali dell'Istituto superiore di sanita*. 2009;45(2):178-84.
290. Burckhardt JJ, Gaegauf-Zollinger R, Guggenheim B. Development of immunological sensitization and alveolar bone loss in gnotobiotic rats infected with *Actinomyces viscosus* Ny 1. *Journal of periodontal research*. 1981;16(2):147-58.

291. Gaspersic R, Stiblar-Martincic D, Skaleric U. Influence of restraint stress on ligature-induced periodontitis in rats. *European journal of oral sciences*. 2002;110(2):125-9.
292. 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. *Journal of periodontal research*. 2003;38(3):351-3.
293. Breivik T, Stephan M, Brabant GE, Straub RH, Pabst R, von Hörsten S. Postnatal lipopolysaccharide-induced illness predisposes to periodontal disease in adulthood. *Brain, behavior, and immunity*. 2002;16(4):421-38.
294. Dumitrescu AL, Abd-El-Aleem S, Morales-Aza B, Donaldson LF. A model of periodontitis in the rat: effect of lipopolysaccharide on bone resorption, osteoclast activity, and local peptidergic innervation. *Journal of clinical periodontology*. 2004;31(8):596-603.
295. Kingman A, Albandar JM. Methodological aspects of epidemiological studies of periodontal diseases. *Periodontology 2000*. 2002;29:11-30.
296. Aral CA, Kesim S, Greenwell H, Kara M, Çetin A, Yakan B. Alveolar bone protective and hypoglycemic effects of systemic propolis treatment in experimental periodontitis and diabetes mellitus. *Journal of medicinal food*. 2015;18(2):195-201.
297. Kafadar IH, Güney A, Türk CY, Oner M, Silici S. Royal jelly and bee pollen decrease bone loss due to osteoporosis in an oophorectomized rat model. *Eklem hastaliklari ve cerrahisi = Joint diseases & related surgery*. 2012;23(2):100-5.
298. Yamaguchi M. Regulatory mechanism of food factors in bone metabolism and prevention of osteoporosis. *Yakugaku zasshi : Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*. 2006;126(11):1117-37.
299. Yamaguchi M, Hamamoto R, Uchiyama S, Ishiyama K, Hashimoto K. Anabolic effects of bee pollen *Cistus ladaniferus* extract on bone components in the femoral-diaphyseal and-metaphyseal tissues of rats in vitro and in vivo. *Journal of Health Science*. 2006;52(1):43-9.
300. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*. 1999;397(6717):315-23.
301. Lorenzo J, Horowitz M, Choi Y. Osteoimmunology: interactions of the bone and immune system. *Endocrine reviews*. 2008;29(4):403-40.
302. Kresnoadi U, Sari N, Laksono H. Socket preservation using a combination of propolis extract and bovine bone graft towards the expression of receptor activator of nuclear κ B ligand and osteoprogenin. *Folia medica*. 2023;65(5):737-43.
303. Elwakkad AS, El Elshamy KA, Sibaii H. Fish liver oil and propolis as protective natural products against the effect of the anti-epileptic drug valproate on immunological markers of bone formation in rats. *Epilepsy research*. 2008;80(1):47-56.
304. Gu H, An HJ, Kim JY, Kim WH, Gwon MG, Kim HJ, et al. Bee venom attenuates *Porphyromonas gingivalis* and RANKL-induced bone resorption with osteoclastogenic differentiation. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2019;129:344-53.

8. EKLER

EK 1: Etik Onay Belgesi

