



T.C.
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

DENEYSEL PERİODONTİTİS OLUŞTURULAN SIÇANLARDA
ENERJİ İÇECEĞİNİN KEMİK DOKUSU ÜZERİNE
ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Dt. Tuğçe PAKSOY

PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ

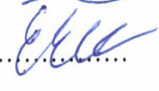
TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Gülbahar USTAOĞLU

Bu çalışma Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından desteklenmiştir.
(Proje numarası: 2015. 06. 05. 940)

EYLÜL 2016
BOLU

T.C.
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
Tez Onay Belgesi

Tezin Başlığı : Deneyisel Periodontitis Oluşturulan Sıçanlarda Enerji
Tezin Savunma Tarihi : 26.09.2016. iaceğinin Kemik Dokusu Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi
Tezin Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Gülbahar USTAÖĞLU

Jüri Başkanı : Yrd. Doç. Dr. Gülbahar USTAÖĞLU 
Üye : Yrd. Doç. Dr. Hakan ÖBDEMİR 
Üye : Yrd. Doç. Dr. Esra ERCAN 

DEKANLIK ONAYI

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.


Prof. Dr. Hasan ORUÇOĞLU

DEKAN V.

ÖZET

DENEYSEL PERİODONTİTİS OLUŞTURULAN SIÇANLARDA ENERJİ İÇECEĞİNİN KEMİK DOKUSU ÜZERİNE ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Enerji içecekleri kafein, taurin, sükroz/glukoz, vitaminler ve ginseng, ginkgo biloba, guarana gibi bazı bitkisel suplemanlardan oluşmakta ve dünya genelinde milyonlarca insan tarafından kullanılmaktadırlar. Bazı çalışmalarda enerji içeceğinin sistemik sağlık üzerine olumsuz etkileri rapor edilmesine rağmen, periodontitisin başlangıcı ve gelişimi üzerindeki etkileri hakkında herhangi bir bilgi yoktur. Bu çalışmanın amacı deneysel periodontitis oluşturulan sıçanlarda düzenli tüketilen enerji içeceğinin kemik doku üzerine etkilerini değerlendirmektir.

Otuz iki Wistar Albino sıçan aşağıdaki gruplara ayrılmıştır: 1) Ligatür bağlanmayan ve distile su uygulanan grup (n=8), 2) Ligatür bağlanmayan ve enerji içeceği uygulanan grup (n=8), 3) Ligatür bağlanan ve distile su uygulanan grup (n=8), 4) Ligatür bağlanan ve enerji içeceği uygulanan grup (n=8). Her iki maksiller kadrındaki 2. Molar dişlerin çevresine submarjinal olarak 3.0 ipek sütür yerleştirilmiştir. Çalışma süresi 14 gündür ve bu periodun sonunda sıçanlar sakrifiye edilmiştir. Üst çeneler uzaklaştırılmıştır. Alveolar kemik seviyesindeki dinamik değişimler Mikro Bilgisayarlı Tomografi (Mikro BT), Histometri ve kemik kaybı için İmmünohistokimyasal reseptörler ile değerlendirilmiştir. Ayrıca kan örnekleri sakrifiye edilme işlemi sırasında toplanmış ve serum Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF), Temel Fibroblast Büyüme Faktörü (Basic Fibroblast Growth Factor, bFGF), Reseptör Aktivatör Nükleer Kappa B Ligand (Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand, RANKL), Osteoprotegerin (OPG) ve RANKL/OPG oranı değerlendirilmiştir.

On dördüncü günün sonunda Kemik Mineral Yoğunluğu (Bone Mineral Density, BMD), Kemik Hacim Fraksiyonu (Bone Volume Fraction, BVF), Trabekül Sayısı (Trabecular Number, Tb.N) değerleri ligatürlen gruplarda ligatürlenmeyen gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azdır ($p<0.05$), oysaki ligatürlen gruplarda Alveolar Kemik Kaybı (Alveolar Bone Loss, ABL) ve Trabeküler Seperasyon (Trabecular Separation, Tb.Sp) ligatürlenmeyen gruplardan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fazladır ($p<0.05$). Mikro BT değerlendirmeleri distile su grupları ile karşılaştırıldığında, enerji içeceği uygulanan gruplarda farklılıklar vardır fakat istatistiksel olarak anlamlı değildir. İmmünohistokimyasal değerlendirme sonuçlarında ligatürlü gruplarda ligatürlü olmayan gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fazla RANKL+ hücreleri ve RANKL/OPG+ hücreleri oranı görülmüştür. Ligatürlen ve enerji içeceği uygulanan grupta en yüksek RANKL hücresi ve RANKL/OPG+ hücre oranı gözlenmiştir. Ayrıca histolojik olarak hesaplanan alveolar kemik kaybı, enerji içeceği gruplarında distile su gruplarına göre anlamlı düzeyde fazladır, özellikle de ligatürlen ve enerji içeceği uygulanan grupta alveolar kemik kaybı en fazladır. Gruplar arasında serum VEGF, bFGF, RANKL, OPG ve RANKL/OPG seviyelerinde anlamlı farklılık yoktur ($p>0.05$).

Bu çalışma düzenli enerji içeceği tüketiminin deneysel periodontitisin başlaması ve ilerlemesinde olumsuz etkilerinin olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Alveolar kemik kaybı, Deneysel periodontitis, Enerji İçeceği, Ligatür ile indüklenen periodontitis, X- ışınlı mikrotomografi, Mikro BT, Mikro Bilgisayarlı Tomografi

ABSTRACT

EVALUATION OF THE EFFECTS OF ENERGY DRINK ON BONE TISSUE IN EXPERIMENTAL PERIODONTITIS IN RATS

Energy drinks consist of many substances like caffeine, taurine, sucrose/glucose, vitamins and some herbal supplements such as ginseng, ginkgo biloba, guarana and are used by millions of people world-wide. Although some studies have reported a negative effect of energy drinks on systemic health, there is no information about its effect on the initial and progression of periodontitis. The aim of this study was to evaluate the effects of regular consumption of energy drinks on bone tissue in experimental periodontitis in rats.

Thirty-two Wistar Albino rats were assigned to one of the following groups: 1) Non-ligature and drinking distilled water group (n=8), 2) Non-ligature and energy drink ingestion group (n=8), 3) Ligature and drinking distilled water group (n=8), 4) Ligature and energy drink ingestion group (n=8). A 3.0 silk suture was placed submarginally around the second molars in both maxillary quadrants. The study duration was 14 days and the animals were sacrificed at the end of this period. Top jaws were removed. Dynamic changes of the alveolar bone levels were evaluated by Micro-computed Tomography, Histometry and Immunohistochemistry of the receptors for bone loss. Also blood samples were taken while sacrificing and serum Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand (RANKL), OPG (Osteoprotegerin) and RANKL/OPG ratio were examined.

At the end of 14 days, Bone Mineral Density (BMD), Bone Volume Fraction (BVF), Trabecular Number (Tb.N) values of the ligated groups were significantly lower than those of the unligated groups ($p < 0.05$), whereas Alveolar Bone Loss (ABL) and Trabecular Separation (Tb.Sp) of the ligated groups were significantly higher than those of the unligated groups ($p < 0.05$). Compared with the distilled water groups, energy drinks administration groups have differences but they were not statistically significant for Micro CT evaluations. The results of immunohistochemical evaluation showed that the level of RANKL and RANKL/OPG ratio in the ligature groups were significantly greater than non-ligature groups. The ligature and energy drink ingestion group presented the highest number of RANKL+ cells and RANKL/OPG+ cells ratio. Also histologically alveolar bone loss in energy drink groups were greater than distilled water group, especially alveolar bone loss was highest in ligated and energy drink ingestion group. There were no differences among groups for serum levels of VEGF, bFGF, RANKL, OPG and RANKL/OPG ($p > 0.05$).

The present study demonstrated that regular consumption of energy drinks may have a negative effects on the induction and progression of experimental periodontitis.

Keywords: Alveolar bone loss, Energy drinks, Experimental periodontitis, Ligature induced periodontitis, X-ray microtomography, Micro CT, Micro computed Tomography

TEŞEKKÜRLER

Uzmanlık eğitimimin tamamlanmasında benden desteğini esirgemeyen, zor şartları kolay hale getiren, her zaman sıcak ve samimi tavrı ile insanın içini ferahlatan, yol göstericiliğini ve hoşgörüsünü hiçbir zaman esirgemeyen, kendisine her zaman minnettar kalacağım ve öğrencisi olmaktan gurur duyacağım değerli danışman hocam Abant İzzet Baysal Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Yrd. Doç. Dr. Gülbahar USTAOĞLU'na,

Asistanlığım boyunca kendilerinden çok şey öğrendiğim, bilgi ve deneyimlerini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli Sayın Hocam Yrd. Doç. Dr. Şadiye COŞKUNER'e,

Tezimin her aşamasındaki yardımlarından, tertemiz kalbi ile gösterdiği saf sevgi ve muhteşem dostluktan ötürü Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi Uzman Hüsniye BİLGE'ye,

Okulu kazanmama ve canım eşimle tanışmama vesile olan, benden desteğini tanıştığımız günden beri hiç esirgemeyen, birtanecik canım dostum Öznur ÖZLÜ'ye,

Beraber klinikte çalışmayı keyifli hale getirdiğimiz, hastane içerisinde ve özel hayatımızda güzel paylaşımlarımız olan, tez çalışmamda desteklerini benden esirgemeyen, bana her zaman yardımcı olan ve artık ikinci ailem haline gelen sevgili, değerli bölüm arkadaşlarım Olgu Alperat KILIÇ, Tuğçe Duygu KORUCUOĞLU, Bilge MERACI, Mehmet Selim YILDIZ, Mehmet Cihan ŞENGÜN, Kerem Çağlar GÜMÜŞ ve kardeş kliniklerdeki canım arkadaşlarım Selin KURDOĞLU, Özge GÜNGÖR, Deniz ÖNAL, Zuhul ULUSOY'a,

Hayatım boyunca her anımda yanımda olan, her zaman beni destekleyen, cesaretlendiren ve seven, en zor anlarımda bana sarılan, sonsuz güvendiğim yarı kalbim olan ve onlara sahip olduğum için kendimi dünyadaki bütün insanlardan daha şanslı hissettiğim, hayattaki en değerli varlıklarım yol arkadaşım canım annem Tülay AKAP, güvenilir baba gibi ağabeyim Ahmet Emrah AKAP'a, son olarak birlikte olmaya başladığımız ilk günden beri sabır ve sevgi ile beni bekleyen, yanımda olamadığı anlarda bile varlığını her zaman hissettiğim, bana güç veren, her zaman kendisi ile gurur duyduğum, kalbimi sonsuz sevgi ile dolduran canım eşim Uğur Emre PAKSOY'a

SONSUZ TEŞEKKÜRLER...

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜRLER	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar	x
ŞEKİLLER	xi
GRAFİKLER	xii
FOTOĞRAFLAR.....	xiii
KISALTMALAR VE SİMGELER	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Periodontal Hastalık	4
2.1.1. Kronik periodontitis.....	6
2.1.2. Kronik periodontitisin etyolojisi.....	7
2.1.3. Kronik periodontitisin patogenezi	7
2.2. Mikroorganizma-Konak Etkileşimindeki İmmünolojik Faktörler ve Mediyatörler.....	9
2.2.1. Nükleer faktör Kappa B (NF-κB) ve aktivasyon mekanizması.....	13
2.2.2. Reseptör aktivatör nükleer Kappa B (RANK).....	13
2.2.3. Reseptör aktivatör nükleer Kappa B ligand (RANKL)	14
2.2.4. Osteoprotegerin (OPG).....	14
2.3. Kemik Yapısı.....	15
2.3.1. Kemik homeostazı ve korunması	15
2.3.2. Kemik hücreleri	16
2.3.3. Kemik remodelinginin hücrel mekanizmaları: yıkım ve oluşum.....	20
2.3.4. Kemik oluşumu.....	22
2.3.5. Mineral ve organik matriksin parçalanması	22
2.3.6. Osteoklastik kemik rezorpsiyonunun düzenlenmesi	24
2.3.7. Kemik rezorpsiyonunun lokal mediyatörleri	26

2.3.8. RANKL ve OPG'nin rolleri.....	27
2.4. Periodontal Hastalığın İmmünopatogenezi	28
2.4.1. Spesifik immün hücrelerin rolü	30
2.4.2. Bakteriyel etki.....	31
2.4.3. Doğal immün cevap, TLRs ve PAMPs	33
2.5. Enerji İçecekleri.....	36
2.5.1. Kafein	37
2.5.2. Taurin.....	37
2.5.3. Arjinin.....	38
2.5.4. Sükroz/Glukoz veya Aspartam/Asesülfam Potasyum	39
2.5.5. B vitaminleri	40
2.5.5.1. Tiamin (Vitamin B1)	40
2.5.5.2. Riboflavin (Vitamin B2).....	40
2.5.5.3. Niasin (Vitamin B3)	40
2.5.5.4. Pantotenik asit (Vitamin B5)	40
2.5.5.5. Piridoksin hidroklorid (Vitamin B6)	41
2.5.5.6. Biotin (Vitamin B7).....	41
2.5.5.7. İnositol (Vitamin B8).....	41
2.5.5.8. Siyanokobalamin (VitaminB12).....	41
2.5.6. Guarana.....	42
2.5.7. Ginseng	42
2.5.8. Ginkgo Biloba.....	43
3. GEREÇ VE YÖNTEM	44
3.1. Denekler ve Değerlendirme Periyodu	44
3.2. Deneklerin Randomizasyonu ve Gruplara ayrılması.....	45
3.3. Deneysel Periodontitis Modeli	47
3.4. Deneysel Protokol	48
3.5. Mikro Bilgisayarlı Tomografi (Mikro BT) Değerlendirmeleri	50
3.6. Histometrik Analiz	57
3.7. İmmünohistokimyasal Analiz.....	58
3.8. Biyokimyasal Analiz	60
3.9. İstatistiksel Analizler	61

4. BULGULAR	62
4.1. Mikro Bilgisayarlı Tomografi Verilerinin Değerlendirilmesi.....	62
4.1.1. Doku hacmi (Tissue Volume, TV)	62
4.1.2. Kemik hacmi (Bone Volume, BV)	63
4.1.3. Kemik hacim fraksiyonu (Perfect Bone Volume=PBV:BV/TV)	64
4.1.4. Trabekül kalınlığı (Trabecular thickness, Tb.Th).....	66
4.1.5. Trabekül sayısı (Trabecular number, Tb.N)	66
4.1.6. Trabeküller arası mesafe (Trabecular separation, Tb.Sp).....	68
4.1.7. Kemik mineral yoğunluğu (Bone Mineral Density, BMD).....	70
4.1.8. KKO (Kemik Kaybı Ortalaması).....	71
4.2. Biyokimyasal Parametrelerin Değerlendirilmesi	73
4.2.1. FGF ₂ ölçümlerinin değerlendirilmesi	73
4.2.2. VEGF ölçümlerinin değerlendirilmesi	74
4.2.3. RANKL ölçümlerinin değerlendirilmesi	74
4.2.4. OPG ölçümlerinin değerlendirilmesi.....	75
4.2.5. Serum RANKL/OPG oranı ölçümlerinin değerlendirilmesi	76
4.3. Histolojik Parametrelerin Değerlendirilmesi.....	77
4.3.1. Histometrik veriler.....	77
4.3.2. İmmünohistokimyal veriler	79
4.3.2.1. RANKL	79
4.3.2.2. OPG	82
4.3.2.3. RANKL/OPG	84
5. TARTIŞMA	86
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	106
7. KAYNAKÇA	108
8. ÖZGEÇMİŞ	128

TABLolar

Tablo 2.1. Periodontal Hastalık Sınıflaması	5
Tablo 2.2. Farklı organ sistemleri üzerine bFGF'ün fonksiyonları	18
Tablo 4.1. Grupların TV dağılımları	62
Tablo 4.2. Grupların BV dağılımları.....	63
Tablo 4.3. İkili gruplar arasında BV değerlerinin karşılaştırılması	63
Tablo 4.4. Grupların PBV dağılımları.....	64
Tablo 4.5. İkili gruplar arasında PBV değerlerinin karşılaştırılması	65
Tablo 4.6. Grupların Tb.Th dağılımları	66
Tablo 4.7. Grupların Tb.N dağılımları	67
Tablo 4.8. İkili gruplar arasında Tb.N değerlerinin karşılaştırılması.....	67
Tablo 4.9. Grupların Tb.Sp dağılımları.....	68
Tablo 4.10. İkili gruplar arasında Tb.Sp değerlerinin karşılaştırılması	69
Tablo 4.11. Grupların BMD dağılımları	70
Tablo 4.12. Gruplar arasında BMD değerlerinin karşılaştırılması.....	70
Tablo 4.13. Grupların KKO dağılımları.....	71
Tablo 4.14. Gruplar arasında KKO değerlerinin karşılaştırılması	72
Tablo 4.15. Grupların FGF ₂ dağılımları.....	73
Tablo 4.16. Grupların VEGF dağılımları	74
Tablo 4.17. Grupların RANKL dağılımları	75
Tablo 4.18. Grupların OPG dağılımları	76
Tablo 4.19. Grupların serum RANKL/OPG oranlarının dağılımları	76
Tablo 4.20. Grupların AKK dağılımları.....	77
Tablo 4.21. Gruplar arasında AKK değerlerinin karşılaştırılması	78
Tablo 4.22. Grupların RANKL dağılımları	79
Tablo 4.23. Gruplar arasında RANKL değerlerinin karşılaştırılması.....	80
Tablo 4.24. Grupların OPG dağılımları	82
Tablo 4.25. Gruplar arasında OPG değerlerinin karşılaştırılması.....	82
Tablo 4.26. Grupların RANKL/OPG dağılımları	84
Tablo 4.27. Gruplar arasında RANKL/OPG değerlerinin karşılaştırılması.....	85

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Periodontal hastalık patogenezindeki immünolojik faktörler	12
Şekil 3.1. Çalışma protokolü diagramı.....	46
Şekil 3.2. Çalışma zaman çizelgesi	46
Şekil 3.3. Ham radyolojik görüntülerin matematiksel analiz için hazır hale getirilmesi	51
Şekil 3.4. Radyolojik görüntülerin 3 düzlemde yeniden konumlandırılması ve küçültülmesi.....	51
Şekil 3.5. MMSS-MKK arasındaki mesafenin ölçülmesi.....	52
Şekil 3.6. FÇ-FKK arasındaki mesafenin ölçülmesi.....	52
Şekil 3.7. DMSS-DKK arası mesafenin ölçülmesi	53
Şekil 3.8. CTAN programında alveolar kemik bölgesinin seçilmesi.....	53
Şekil 3.9. CTAN programında kemik alanlarının belirlenmesi.	54
Şekil 3.10. CTAN programında kemik mineral yoğunluğunun belirlenmesi	54
Şekil 3.11. CTAN programında kemik mikro yapısının belirlenmesi	55
Şekil 3.12. Üç boyutlu Mikro BT görüntüleri.....	56
Şekil 3.13. Alveolar kemik kaybının ölçümü	58

GRAFİKLER

Grafik 4.1. Ortalama TV değerlerinin karşılaştırılması	62
Grafik 4.2. Ortalama BV değerlerinin karşılaştırılması	64
Grafik 4.3. Ortalama PBV değerlerinin karşılaştırılması.....	65
Grafik 4.4. Ortalama Tb.Th değerlerinin karşılaştırılması.....	66
Grafik 4.5. Ortalama Tb.N değerlerinin karşılaştırılması	68
Grafik 4.6. Ortalama Tb.Sp değerlerinin karşılaştırılması.....	69
Grafik 4.7. Ortalama BMD değerlerinin karşılaştırılması	71
Grafik 4.8. Ortalama KKO değerlerinin karşılaştırılması.....	72
Grafik 4.9. Ortalama serum FGF ₂ değerlerinin karşılaştırılması	73
Grafik 4.10. Ortalama serum VEGF değerlerinin karşılaştırılması	74
Grafik 4.11. Ortalama serum RANKL değerlerinin karşılaştırılması.....	75
Grafik 4.12. Ortalama serum OPG değerlerinin karşılaştırılması.....	76
Grafik 4.13. Ortalama serum RANKL/OPG değerlerinin karşılaştırılması.....	77
Grafik 4.14. Ortalama AKK değerlerinin karşılaştırılması.....	79
Grafik 4.15. Ortalama RANKL değerlerinin karşılaştırılması.....	81
Grafik 4.16. Ortalama OPG değerlerinin karşılaştırılması.....	83
Grafik 4.17. Ortalama RANKL/OPG değerlerinin karşılaştırılması.....	85

FOTOĞRAFLAR

Fotoğraf 3.1. Sıçanların 8’li gruplar halinde barındırılması	44
Fotoğraf 3.2. Model oluşumu için anestezi solüsyonların hazırlanması.....	47
Fotoğraf 3.3. İntramusküler enjeksiyonun uygulanması.....	47
Fotoğraf 3.4. Deneysel periodontitis modelinin oluşturulması.....	48
Fotoğraf 3.5. Kullanılan enerji içeceği.....	48
Fotoğraf 3.6. Kullanılan distile su.....	49
Fotoğraf 3.7. Gavaj uygulaması	49
Fotoğraf 3.9. Mikro BT Cihazı	50
Fotoğraf 4.2. OPG immün boyaması 40X büyütme	83

KISALTMALAR VE SİMGELER

ATP	Adenozin Trifosfat
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BMD	Bone Mineral Density
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BSP	Bone Sialoprotein
BV	Bone Volume
CA	Carbonic Anhydrase
Ca⁺²	Kalsiyum
cAMP	cyclic Adenosine Monophosphate
Cl⁻	Klor
CSF-1	Colony-Stimulating Factor
DICOM	Digital Imaging and Communication in Medicine
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DOS	Diş eti oluğu sıvısı
DS	Distile Su
EGF	Epidermal Growth Factor
Eİ	Enerji İçeceği
ELİSA	Enzim-Linked Immünosorbant Assay
gr	Gram
H⁺	Hidrojen
HCO₃⁺	Bikarbonat
ICAM	Intercelular Adhesion Molecule
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL-11	İnterlökin-11
IL-1β	İnterlökin-1β
IL-6	İnterlökin-6
K⁺¹	Potasyum
Kg	Kilogram
kV	Kilovolt
LFA	Lymphocyte Function Associated Antigen
LPS	Lipopolisakkarit

mA	Miliamper
Mikro BT	Mikro Bilgisayarlı Tomografi
MDP	Mikrobiyal Dental Plak
mg	Miligram
Mg⁺²	Magnezyum
ml	Mililitre
mm	Milimetre
MMP	Matriks Metalloproteinaz
n	Number
Na⁺	Sodyum
NADH	Nikotinamidadenindinükleotid
NF-κB	Nükleer Faktör Kappa B
NO	Nitrik Oksit
°C	Santigrat derece
OCN	Osteokalsin
OPG	Osteoprotegerin
OPN	Osteopontin
PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBV	Perfect Bone Volume
pg	Pikogram
PGE₂	Prostaglandin E ₂
PKA	Protein Kinase A
PMN	Polimorfonükleer
PTH	Paratiroid Hormon
RANK	Reseptör aktivatör nükleer kappa B
RANKL	Reseptör aktivatör nükleer kappa B Ligand
RB	Ruffled Border
RNA	Ribonükleik Asit
SST	Serum Seperatör Tüpü
Tb.N	Trabecular Number
Tb.Sp	Trabecular Separation
Tb.Th	Trabecular Thickness
TGF	Transforming Growth Factor
Th1	T helper 1
Th2	T helper 2

TIMPs	Tissue Inhibitors of Metalloproteinases
TLR	Toll-Like Reseptör
TNF-α	Tümör Nekrozis Faktör-alfa
TRAP	Tartrate-Resistant Acid Phosphatase
TV	Tissue Volume
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VPF	Vasküler Permeabilite Faktörü



1. GİRİŞ

Periodontitis spesifik mikroorganizmalar ya da spesifik mikroorganizma grupları tarafından oluşturulan dişlerdeki destekleyici dokuların enflamatuvar hastalığı olarak tanımlanır. Periodontitis; artan periodontal cep derinliği, diş eti çekilmeleri ile birlikte alveolar kemik ve periodontal ligamentin ilerleyen yıkımı ile sonuçlanmaktadır. Periodontitisi gingivitisten ayıran klinik özellik klinik olarak tespit edilebilen ataşman kaybıdır. Ataşman kaybına genellikle alttaki alveolar kemiğin yükseklik ve yoğunluğundaki değişiklikler ve periodontal cep oluşumu eşlik etmektedir. Gingival renk, kontur ve sıkılıkta değişim gösteren enflamasyona bağlı klinik belirtiler ve sondalamada kanama her zaman devam eden ataşman kaybının pozitif belirleyicisi olmayabilir. Takip eden ziyaretlerdeki devam eden sondalamada kanama varlığı enflamasyon varlığının gerçek belirleyicisidir ve kanayan alanlarda sonraki ataşman kayıpları için potansiyeldir (1).

Kronik periodontitis, periodontitisin en yaygın formudur (1). Kronik periodontitis plak ve diş taşı birikimi ile ilişkilidir ve genellikle hastalık ilerlemesinde yavaştan ortaya hız göstermektedir. Hastalığın ilerleme hızındaki artış normal konak-bakteri ilişkisini etkileyebilen lokal, sistemik veya çevresel faktörlerin etkisi ile oluşabilmektedir. Dişlere bağlı anatomik faktörler, dental restorasyonlar ve uygulamalar gibi lokal faktörler plak birikimini; diabetes mellitus ve HIV enfeksiyonları gibi sistemik hastalıklar konak savunmasını ve sigara kullanımı, stres gibi çevresel faktörler de plak birikimine karşı gelişen konak cevabını etkileyebilir (2).

Periodontitis gingival dokuların enfeksiyöz hastalığı olmasına rağmen, kemikte meydana gelen değişimler çok önemlidir çünkü kemikteki yıkım diş kaybından sorumludur. Alveolar kemikteki yükseklik ve yoğunluk, kemik yapımı ve yıkımı arasındaki lokal ve sistemik etkiler ile düzenlenen denge tarafından korunmaktadır. Kemik yıkımı kemik oluşumunu aştığında, hem kemik yüksekliği hem de yoğunluğu azalabilmektedir. Kemik seviyesindeki değişimler geçmişteki patolojik olayların sonucudur, oysa ki cep duvarının yumuşak doku değişimleri var olan enflamasyon durumunu yansıtmaktadır. Bu nedenle kemik kaybının derecesi

periodontal ceplerin derinliği, cep duvarındaki ülserasyonun şiddeti veya pü varlığı ya da yokluğu ile ilişkili olmak zorunda değildir (1). Periodontitisin ilerlemesialveolar kemik kaybı ile karakterizedir ve kemik kaybının önlenmesi periodontal hastalığın tedavisinde anahtar klinik sorundur. Kemik yıkımı mikrobiyal problemlere karşı konak immün ve enflamatuvar cevap ile ilişkilendirilmektedir (3).

Kemik, osteoklastlar ve osteoblastlar aracılığı ile sürekli olarak rezorpsiyon ve formasyonun devam ettiği dinamik bir dokudur ve bu süreç kemik remodelingi olarak bilinmektedir. Kemik aynı zamanda normal Ca^{+2} plazma seviyesinin korunması için Ca^{+2} kaynağı olarak görev yapan fizyolojik vital bir dokudur (5). Besinlerden ve/veya ek gıdalardan Ca^{+2} ve vitamin D'nin genç yaşlarda iken yeterli miktarda tüketimi ileriki yaşlarda kemik kaybı hızını azaltmak için gereklidir (5). Günlük olarak alınan diyet komponentleri normal kemik metabolizması için oldukça gereklidir (6, 7).

Çok çeşitli endojenöz ve ekstrasjenöz faktörler kemik dokunun formasyonu, absorpsiyonu ve remodelingini kontrol etmekte ve olumlu veya olumsuz olarak etkilemektedir. Çeşitli laboratuvar ve klinik çalışmalar ile antioksidanlar, tıbbi bitki özütları, aminoasitler ve vitaminler kullanılarak yumuşak doku ve sert doku kemik metabolizması üzerine yeni yaklaşımlar geliştirilmektedir (8).

Enerji içecekleri son birkaç yıldır dünya çapında hedef kitle olarak özellikle gençler ve genç yetişkinler arasında internet, reklam ve televizyon kampanyaları sayesinde oldukça popüler olarak tüketilmektedir (9, 10). Metabolizmayı hızlandırdığı, vücut direncini arttırdığı ve enerji verdiğine inanıldığı için her yaşta kullanılmakla birlikte, özellikle 11-35 yaşları arasındaki öğrenci, sporcu ve yoğun çalışan bireyler tarafından daha yaygın olarak tüketilmektedir (11). Bu içecekler genellikle çeşitli yararlar sağlayan fonksiyonel içecekler olarak pazarlanmaktadır; özellikle konsantrasyon ve zihinsel performansı geliştirerek zaman içinde performansı, uyanıklığı arttırdığı ve yorgunluğu azalttığı düşünülmektedir (12).

Dünyada çok sayıda farklı marka enerji içeceği bulunmaktadır ve her yıl yaklaşık olarak 4 milyar kutu sadece Redbull® marka enerji içeceği tüketilmektedir (13). Enerji içecekleri genellikle çok çeşitli maddeleri içermektedir, sıklıkla

içeriğinde bulunanlar: kafein, taurin, sükröz/glukoz, vitaminler ve guarana, ginseng ve ginkgo biloba gibi bitkisel suplemanlardır.

Yapılan literatür taramasında enerji içeceğinin yumuşak doku yara iyileşmesi üzerine etkilerini değerlendiren deneysel bir çalışma bulunmaktadır (14). Ancak ağız içinde sert alveolar kemik doku üzerine etkilerini araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Literatürdeki bu eksiklikten yola çıkarak bu araştırmada yaygın bir şekilde kullanılmakta olan enerji içeceğinin (RedBull®), deneysel periodontitis oluşturulmuş sıçanlarda alveolar kemik üzerindeki etkisinin; mikro bilgisayarlı tomografi ile ve histometrik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal olarak incelenmesi amaçlanmaktadır.

Bu çalışma kapsamında olası hipotezler aşağıda sıralanmıştır:

1. Kronik enerji içeceği kullanımının alveolar kemik yapı üzerinde olumsuz etkileri bulunmaktadır.
2. Yaygın bir şekilde kullanılmakta olan enerji içeceğinin periodontal hastalığın gelişimi üzerinde indükleyici etkileri bulunmaktadır.
3. Enerji içeceğinin tüketiminin kısıtlanması periodontal sağlık açısından önem taşımaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Periodontal Hastalık

Periodontal hastalıklar; bağ dokusu kaybı, alveolar kemik rezorpsiyonu ve periodontal cep formasyonu ile karakterize kronik enflamatuvar hastalıklardır (15). Dünya popülasyonunun %10-15'ini etkileyen bu hastalıklaryetişkinlerde görülen diş kaybının en önemli sebeplerinden biridir (16, 17).

Dental plakta yer alan bakteriler, toksinler, enzimler ve metabolitler periodontal hastalığın gelişmesinde ve enflamatuvar cevabın başlamasında rol oynayan primer faktörlerdir (18). Enflamasyon doku hasarından sorumlu uyarıların ortamdaki uzaklaştırılmasını ve dokunun tamirini sağlar ancak bakteriyel uyarının sürekli olması enflamasyonun kronik bir hal almasına sebep olur. Ayrıca enflamasyon esnasında oluşan yetersiz ve aşırı konak cevabı doku hasarıyla sonuçlanır (19).

Mikrobiyal Dental Plak (MDP) periodontal hastalıkların başlamasında ana faktör olmakla birlikte; hastalığın başlaması ve ilerlemesinde çeşitli sistemik hastalıklar, genetik faktörler, stres, sigara kullanımı ve beslenme gibi faktörler de etkili olmaktadır (20).

Periodontal hastalıklar; klinik bulguları, immünolojik özellikleri, doku değişikliği veya doku kaybının derecesi, etkilediği periodontal bölgeler, hastalığın seyri, mikrobiyal flora gibi kriterler göz önüne alınarak bilimsel tanı ve tedavi yöntemlerindeki gelişmeler eşliğinde çeşitli şekillerde sınıflandırılmıştır.

Amerikan Periodontoloji Akademisi tarafından önerilen en son sınıflandırmaya göre periodontal hastalıklar aşağıdaki şekilde sınıflandırılmaktadır (21) :

Tablo 2.1. Periodontal Hastalık Sınıflaması

- I- Dişeti Hastalıkları
 - A. Dental plağa bağlı dişeti hastalıkları
 - 1. Sadece dental plağa bağlı gingivitis
 - a. Lokal kolaylaştırıcı faktörlerin katılmadığı
 - b. Lokal kolaylaştırıcı faktörlerin katıldığı
 - 2. Sistemik faktörlerle modifiye edilen dişeti hastalıkları
 - a. Endokrin sistem ile ilişkili olanlar
 - 1) Puberte ile ilişkili gingivitis
 - 2) Menstrual siklus ile ilişkili gingivitis
 - 3) Hamilelik ile ilişkili gingivitis
 - a) Gingivitis
 - b) Pyojenik granüloma
 - 4) Diabetes mellitus ile ilişkili gingivitis
 - b. Kan hastalıkları ile birlikte görülen
 - 1) Lösemi ile ilişkili gingivitis
 - 2) Diğerleri
 - 3. İlaç kullanımı ile modifiye edilen dişeti hastalıkları
 - a. İlaça bağlı dişeti büyümeleri
 - b. İlaça bağlı gingivitis
 - 1) Oral kontraseptifler
 - 2) Diğerleri
 - 4. Kötü beslenme ile modifiye olan dişeti hastalıkları
 - a. Absorbik asit eksikliğine bağlı gingivitis
 - b. Diğer
 - B. Dental plağa bağlı olmayan dişeti hastalıkları
 - 1. Spesifik bakteri kökenli dişeti hastalıkları
 - a. Neisseria gonorrhea ile ilişkili lezyonlar
 - b. Treponema pallidum ile ilişkili lezyonlar
 - c. Streptokoklar ile ilişkili lezyonlar
 - d. Diğerleri
 - 2. Virüs kökenli dişeti hastalıkları
 - a. Herpes virüs enfeksiyonları
 - 1) Primer herpetik gingivostomatitis
 - 2) Rekürrent oral aft
 - 3) Varicella-zoster enfeksiyonları
 - b. Diğer
 - 3. Mantar kökenli dişeti hastalıkları
 - a. Candida enfeksiyonları
 - 1) Yaygın gingival kandidozis
 - b. Linear gingival eritem
 - c. Histoplasmozis
 - d. Diğer
 - 4. Genetik kökenli dişeti hastalıkları:
 - a. Hereditär gingival fibromatozis
 - b. Diğer
 - 5. Sistemik durumların dişeti belirtileri
 - a. Mukokütanöz hastalıklar
 - 1) Liken planus
 - 2) Pemfigoid
 - 3) Pemfigus vulgaris
 - 4) Eritema multiforme
 - 5) Lupus eritematozis
 - 6) İlaça bağlı
 - 7) Diğer
 - b. Alerjik reaksiyonlar
 - 1) Dental restoratif metaryeller
 - a) Civa
 - b) Nikel
 - c) Akril
 - d) Diğerleri
 - 2) Reaksiyona neden olan çeşitli maddeler
 - a) Diş macunu
 - b) Gargaralar
 - c) Sakız maddeleri
 - d) Yiyecek ve katkı maddeleri
 - 6. Travmatik lezyonlar
 - a. Kimyasal yaralanmalar
 - b. Fiziksel yaralanmalar
 - c. Termal yaralanmalar
 - 7. Yabancı cisim reaksiyonları
 - 8. Tanımlanmamış olanlar
 - II. Kronik Periodontitis
 - A. Lokalize
 - B. Generalize (Yaygın)
 - III. Agresif Periodontitis
 - A. Lokalize
 - B. Generalize (Yaygın)
 - IV. Sistemik Hastalıklarla Birlikte Görülen Periodontitis
 - A. Hematolojik hastalıklarla ilişkili olanlar
 - 1. Nötropeni
 - 2. Lösemi
 - 3. Diğer
 - B. Genetik hastalıklarla ilişkili olanlar
 - 1) Ailesel ve siklik nötropeni
 - 2) Down sendromu
 - 3) Lökosit adezyon yetmezliği sendromları
 - 4) Papillon-Lefevre sendromu
 - 5) Chediak-Higashi sendromu
 - 6) Histiositozis sendromları
 - 7) Glikojen depo hastalığı
 - 8) İnfanitil genetik agranülositozis
 - 9) Cohen sendromu
 - 10) Ehlers-Danlos sendromu
 - 11) Hipofosfatazi
 - 12) Diğer
 - V. Nekrotizan Periodontal Hastalıklar
 - A. Nekrotizan ülseratif gingivitis (NUG)
 - B. Nekrotizan ülseratif periodontitis (NUP)
 - VI. Periodonsiyum Apşeleri
 - A. Gingival apse
 - B. Periodontal apse
 - C. Perikoronar apse
 - VII. Endodontik Lezyonlarla İlişkili Periodontitis
 - VIII. Gelişimsel veya Kazanılmış Deformiteler
 - A. Plağa bağlı dişeti hastalıklarını kolaylaştıran veya modifiye eden lokalize diş ile ilişkili faktörler
 - 1. Dişe ait anatomik faktörler
 - 2. Dental restorasyonlar ve apareyler
 - 3. Kök kırıkları
 - 4. Servikal kök rezorpsiyonları ve sement aşınmaları
 - B. Diş çevresindeki mukogingival deformiteler
 - 1. Dişeti çekilmesi
 - 2. Keratinize dişeti eksikliği
 - 3. Azalmış vestibül derinlik
 - 4. Yüksek frenulum/kas bağlantıları
 - 5. Dişetin boyut artışı
 - a. Pseudo cep
 - b. Yetersiz gingival marjin
 - c. Dişeti kenarındaki düzensizlik
 - d. Dişeti büyümesi
 - 6. Anormal renk
 - C. Dişsiz Kretteki Mukogingival Deformiteler ve Durumlar
 - 1. Vertikal ve/veya horizontal kret yetersizliği
 - 2. Dişeti/keratinize doku eksikliği
 - 3. Dişeti/yumuşak doku büyümeleri
 - 4. Yüksek frenulum/kas bağlantıları
 - 5. Azalmış vestibül derinlik
 - 6. Anormal Renk
 - D. Okluzal Travma
 - 1. Primer okluzal travma
 - 2. Sekonder okluzal travma

2.1.1. Kronik periodontitis

Kronik periodontitis, periodontitisin en yaygın görülen formudur. Genellikle yavaş ilerleyen bir hastalık olarak tanımlanmasına rağmen sistemik ve çevresel faktörler konak cevabını etkileyebilir ve hastalık daha agresif seyredebilir. Daha çok yetişkinlerde görülmesine rağmen çocuklarda, adolesanlarda kısacası her yaşta görülebilir (22).

Tedavi edilmemiş kronik periodontitisin klinik bulguları; supragingival ve subgingival diştaşı ve plak birikimi, gingival enflamasyon, dişetinde renk değişikliği, stiplinglerin kaybolması, keskin olmayan yuvarlak hatlı diş eti kenarı, sondlamada kanama, periodontal dokuların sondlamaya karşı dirençlerinde azalma, klinik ataşman kaybı, alveolar kemik kaybı ve süpürasyon olarak sayılabilir. Ayrıca bazı vakalarda dişeti büyümesi veya dişeti çekilmesi, kök ve furkasyon bölgelerinin açığa çıkması, artmış diş mobilitesi de görülebilmektedir. Hastalık genellikle ağrısız seyreder ancak bazen açığa çıkmış kök yüzeylerinin ısıya veya soğuğa karşı hassas olması ya da çürük varlığında ağrı şikayetleri görülebilir. Lokalize künt ve bazen de çeneye yayılan bir ağrı olabilir. Akut ağrı periodontal apsenin görülmesi ile ortaya çıkar. Dişetinde ödem ve kaşıntı hissi vardır. Radyografik incelemede kemik kaybı vertikal ya da horizontal olarak görülebilir (22).

Kronik periodontitis, ağız içerisinde etkilediği her bölgede eşit oranda yıkım göstermez. Bazı bölgeler yıllar boyunca aynı kalırken (23), bazı bölgelerde çok şiddetli yıkımlar görülebilir ve bu yıkımlar genellikle interproksimal alanlarda ve plak kontrolünün yeterince sağlanamadığı bölgelerde izlenir (24). Kronik periodontitis, etkilenen diş sayısına bağlı olarak lokalize ve generalize olmak üzere iki grupta tanımlanır. Etkilenmiş dişlerin sayısı tüm dişlere oranla %30'dan az ise lokalize, %30'dan çok ise generalizedir. Hastalık genellikle generalize formda izlenir (2).

Lokalize ve generalize form da klinik ataşman kaybının miktarına bağlı olarak 3 alt gruba ayrılmaktadır; klinik ataşman kaybı 1-3 mm arasında ise hafif şiddetli, 3-5 mm arasında ise orta şiddetli, 5 mm veya daha fazla ise şiddetli olarak sınıflandırılır (22).

2.1.2. Kronik periodontitisin etyolojisi

Kronik periodontitisin esas sebebi MDP'dir. MDP'nin içeriği ise mikroorganizmalardır. Mikroskopik incelemelerde plak içerisinde 500'den fazla bakteri türü olduğu tespit edilmiştir. 1 gr plakta yaklaşık 10^{11} adet bakteri bulunduğu rapor edilmiştir (25). Periodontitis oluşumunda ve ilerlemesinde belirgin rolleri olan bakteriler 'periodontopatojen' olarak adlandırılmaktadır. Bu bakterilerden; *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Campylobacter rectus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Peptostreptococcus*, *Treponema denticola* ve spiroketler en önemlileridir (26). Mikrobiyal dental plaktaki periodontopatojenlerin miktarı, patojenitesi ve bu patojenlere karşı konağın cevabı (immün durum, genetik ve risk faktörlerinin varlığı) periodontal yıkımın ortaya çıkmasında ve ilerlemesinde etkilidir (27).

Restorasyonlar, dişin anatomik yapısı, çürük ve kök rezorpsiyonları gibi plak birikimini kolaylaştıran veya etkisini arttıran değişik lokal faktörler de periodontal hastalık etiyolojisinde önemli rol oynar. Ayrıca cinsiyet (28), yaş (22), sigara içme (29), diyabet (30), stres (31), sistemik hastalıklar (32), hamilelik gibi hormonal değişimler (33), beslenme (16), AIDS (34), osteoporoz (35) ve Down Sendromu (36) gibi hastalıklar da periodontal hastalığın başlaması ve ilerlemesinde etkili olan risk faktörleridir.

2.1.3. Kronik periodontitisin patogenezi

Patogenez terimi genel olarak hastalığın ilerleyişini belirtir. Periodontal hastalığın patogenezi, doğal ve kazanılmış immün cevabı içeren oldukça karmaşık enflamatuvar bir süreçtir (37) ve pek çok faktörün etkisi altındadır (18).

Periodontitisin oluşması ve ilerlemesi için hastalığa yol açan patojen mikroorganizmaların ortamda bulunması gerekir. Periodontal mikroorganizmaların patojenitesi periodontal dokularda kolonize olabilmeleri, konağın antibakteriyel savunma mekanizmalarını aşabilmeleri, direkt doku yıkımını başlatabilecek maddeleri salgılayabilmeleri ile karakterizedir. Gingival sulkus bakterilerin

büyümesi için elverişli bir ortam olmasına karşın, subgingival alanda bir bakteri türünün kolonize olabilmesi için çok sayıda konak kaynaklı engeli aşması gerekmektedir. Subgingival plakta bulunan periodontal patojenlerin hastalık başlatmak ve ilerletmek için gerekli olan sayısal seviyeye ulaşmasıyla koruyucu bariyerler geçilmiş olur (38).

Dento-gingival marjinde kolonize olan bakteriyel meydan okumaya karşı konak, periodontal cebin altındaki dokuda enflamatuvar hücre infiltrasyonu ile cevap verir (39). Page & Schroeder 1976 yılında periodontal hastalıkları klinik ve histopatolojik evrelerine göre sınıflandırmış ve periodontal enflamasyonu 4 histopatolojik evreye ayırmıştır; a) Başlangıç lezyonu b) Erken lezyon c) Yerleşmiş lezyon d) İlerlemiş lezyon (39).

Periodontal dokularda gelişen başlangıç lezyonu mikrobiyal uyarıya karşı gelişen fizyolojik bir cevaptır. Hastalığın bu evresinde klinik olarak diştaşı ve gingival enflamasyonun eşlik ettiği subgingival ve supragingival plak formasyonu mevcuttur, klinik enflamasyon belirtileri yoktur ve dokudaki değişiklikler ancak histolojik olarak gözlemlenebilir. Eğer plak ve eklentiler uzaklaştırılırsa enflamasyon çözülerek dokuda homeostazi sağlanır ancak enflamasyon devam ederse olay patolojik hale gelerek devamında erken lezyon gelişir. Erken lezyonda bakterilerin metabolik ürünleri birleşim epitel hücrelerini sitokin salınımı, nötrofilleri de nöropeptit üretimi için uyarır. Bunun sonucunda lokal kan damarlarında vazodilatasyon oluşur. Nötrofiller kemokinlerin uyarısıyla damarı terk ederek enflamasyon alanına doğru göç eder. Erken lezyonun ilerleyen safhalarında bağ dokusunda nötrofil artışı ve ortamda makrofaj, lenfosit, plazma hücreleri ve mast hücrelerinin varlığı gözlenir. Kompleman proteinleri aktive olur. Epitel de rete pegler oluşturmak üzere proliferer olur ve klinik olarak enflamasyonun belirtisi olan kanama görülebilir. Dişeti oluşu sırasında artış gözlenir. Erken lezyonunun ilerlemesi sonucu yerleşmiş lezyon gelişir ve immün cevabın yerini kazanılmış immün cevap alır. Bu evrede makrofajlar, plazma hücreleri, T ve B lenfositler baskındır. Bu evrede kan akımı bozulmuş kollajenolitik aktiviteyle birlikte, fibroblastların ürettiği kollajen yapımı artmıştır. Klinik olarak hafiften şiddetliye değişen gingivitis tablosu gözlenir. Histolojik olarak epitelde rete peg artışı gözlemlenir. Son evrede ise yerleşmiş

lezyon, ilerlemiş lezyona yani periodontitise dönüşür. Klinik olarak ataşman kaybı ve kemik kaybı gözlenir (40).

2.2. Mikroorganizma-Konak Etkileşimindeki İmmünolojik Faktörler ve Mediyatörler

Periodontal patojenlerin direkt olarak doku hasarına yol açabilen virülans faktörleri olsa da periodontal hastalıkta doku yıkımı, periodontal enfeksiyonun tetiklediği konağa ait yıkıcı ve koruyucu mekanizmalar arasındaki dengenin bozulmasından kaynaklanmaktadır. Mikrobiyal antijenler ve virülans faktörleri konakta hızlı bir iltihabi ve immün cevabın oluşmasına neden olur. Konak, mikrobiyal ürünlere karşı sitokinler, kininler, Matriks Metalloproteinazlar (MMP) üreterek ve kompleman sistemini aktive ederek cevap verir. Bu iltihabi mediyatörler ise, periodontal dokuların yıkımında rol oynamaktadır (41).

Enfeksiyöz veya enflamatuvar uyarana karşı, doğal immün ve kazanılmış immün cevap olmak üzere iki cevap oluşur. Doğal immünite, ağız epitelinin fiziksel ve biyokimyasal koruyucu özelliklerini, enflamatuvar cevabın damarsal ve hücresel olaylarını kapsamaktadır. Enfeksiyon ve enflamasyona karşı ani koruma sağlayan koruyucu bu cevapmikroorganizmaların ve yabancı yapıların makrofajlar ve nötrofiller tarafından fagositozu ile karakterize ve nonspesifiktir (42). Doğal immünite doğuştan itibaren mevcuttur, daha önce karşılaşılan patojenler sonucunda gelişmez ve enfeksiyonlara karşı ilk savunma hattını oluşturur (38). Hızlı olma avantajına karşın, özgünlükten yoksundur ve konağın zararına işleyebilir (38). Doğal bağışıklık sistemi, bağışıklık sistemi hücrelerinin toplanmasında, kompleman sisteminin aktivasyonunda, yabancı maddelerin tanınmasında ve ortadan kaldırılmasında ve kazanılmış bağışıklık sisteminin aktivasyonunda rol oynar (42).

İltihabın başlaması ile birlikte damarsal değişiklikler ve kompleman sistem aktivasyonu gerçekleşir. Kompleman sistem de C3a, C4a, C5a gibi anaflatoksinleri üreterek lökositlerin ve mast hücrelerinin degranüle olmasını sağlar. Böylece vasküler değişiklikleri dolaylı yoldan tetikleyerek, bağışıklık sistemine ait koruyucu hücrelerin ve mediyatörlerin kandan dokulara geçişini sağlar. Ayrıca bu proteinler direkt olarak bakterileri öldürebilme özelliğine de sahiptirler (40, 43).

Makrofaj ve nötrofil gibi fagositler bakteri yüzey moleküllerini tanıyan ve bu yüzeylere bağlanan reseptörlere sahiptirler (44). Toll Benzeri Reseptörler (Toll-Like Receptor, TLR) içeren bu tanıyıcı reseptörler konak ve bakteriyi birbirinden ayırt edebilme özelliğine sahiptirler (45). Toll Benzeri Reseptör aktivasyonu ile birlikte hücre içi sinyalizasyon uyarılır. Bu durum transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu, ardından enflamatuvar sitokin salınımı, lökosit migrasyonu ve osteoklastogenezis ile sonuçlanır (40). Enfeksiyonlara karşı ilk savunma hattını yöneten TLR sistemi adaptif immün yanıt için de ikincil uyarı sağlar (46).

Kompleman sistem, periodontopatojenleri kontrol etmede başarılı olamazsa doğal bağışıklık sisteminin hücreleri olan nötrofiller, periodontal iltihabın akut döneminde endotellerden göç ederek periodontopatojen bakterilere karşı verilen konak savunmasının ilk hattını oluştururlar. Diş eti oluşunda biriken bu hücreler subgingival plak ve gingival doku arasında bir bariyer meydana getirirler. Fagositik hücreler olan monositler ise, konak savunmasının 2. hattını oluştururlar ve sadece enfeksiyonun devam ettiği, nötrofillerin etkisiz kalmaya başladığı durumlarda aktive olurlar (47).

Aktive olan monositler endoteli geçtikten sonra bağ dokusuna yerleşerek makrofajlara olgunlaşırlar. Makrofajlar, konak cevabını, akut enflamatuvar durumdan bağışıklık sistemine ait aracı moleküllerin konak cevabını şekillendirdiği kronik bir patolojiye dönüştürerek, periodontal hastalığın ilerlemesinde anahtar rol oynarlar. Doku içerisinde Lipopolisakkarit (LPS) ile aktif hale geçen makrofajlardan bir grup sitokin ve yüzey reseptörü salgılanır. Bu ürünler patojeni direkt olarak hedef alan, antijene özgü immün cevabı başlatır ve enflamatuvar yanıtı şiddetlendirir (48).

Başlangıç immün yanıtı ilave olarak harekete geçen kazanılmış immün sistem ise vücut hücrelerini istenmeyen istilacılardan ayırt edebilme özelliğine sahiptir. Etken patojenlere karşı konakta gelişen spesifik bir cevap olduğu için daha etkilidir. Kazanılmış immün sistemin en önemli görevleri; antijen sunumunda antijenleri tanımak, spesifik patojenlerin ortamdan uzaklaştırılmasına yönelik bir cevap geliştirmek ve bir sonraki enfeksiyonlarda patojenlerin antijen işaretlerini hatırlamaktır. T lenfositler ve B lenfositler bu sistemin en önemli hücreleridir. Bir hasar oluştuğunda T ve B lenfositlerin proliferasyonunda artış olur. Antijen ve yoğun

sitokin varlığında bu hücreler genişleyip çoğalarak CD4+ ve CD8+ T hücrelerini oluştururlar (49). Antijenik stimülasyondan sonra aktive olan CD4+T hücreleri yardımcı T hücre 1 (T helper 1, Th1) ve 2 (T helper 2, Th2) olmak üzere farklı etkilere sahip iki hücre grubuna farklılaşır. Yardımcı T1 hücreler, ağırlıklı olarak hücresel immün yanıtı kontrol ederken; ikincil olarak da B lenfositlerin ve plazma hücrelerinin baskılanmasında görev alır. T1 tip fenotip, karakteristik olarak hücresel immünite ile ilişkili ve proenflamatuvar özelliklere sahip iken Th2, humoral immünite ile ilişkilidir ve antienflamatuvar özellik gösterir. Th2, B hücreleri indükler ve ikincil fonksiyon olarak da T hücre ilişkili cevapları baskılar, ayrıca mikroorganizmaların eliminasyonunda görev alırlar. T ve B hücreler, makrofajları destekleyerek ve öldürücü hücre oluşumuna yardım ederek immün cevabı artırır (42).

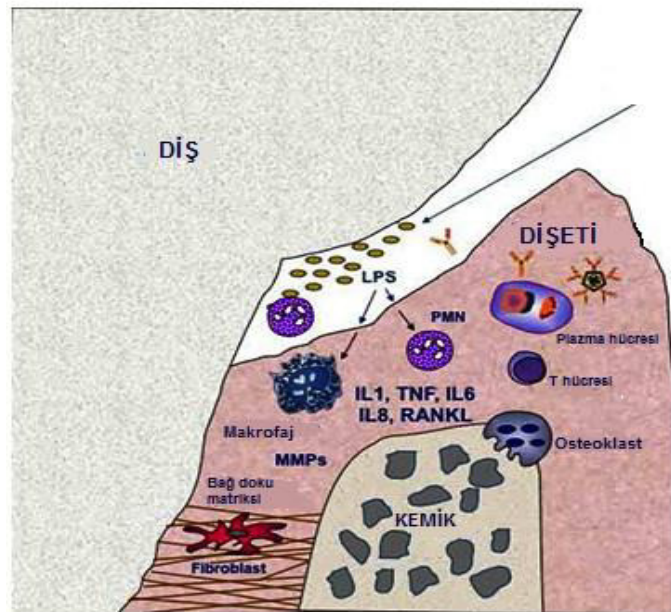
B hücreleri ise antikor sentezleyen plazma hücrelerine dönüşür. Diş eti oluğu veya cep duvarında biriken çok sayıda plazma hücresi bakterilere özgü spesifik antikorlar üreterek bakteri fagositozuna neden olur (49). Enfeksiyona karşı immün cevap sitokin ve kemokin sinyalleriyle düzenlenir. Sitokinler enflamasyonun başlangıcında ve ilerleyen safhalarında yer alırlar. Sitokinler enflamasyonun akut ve erken kronik fazında fibroblastlar, epitelial hücreler ve fagositler tarafından, yerleşmiş ve ilerlemiş lezyonda ise lenfositler tarafından üretilir (50). Proenflamatuvar sitokinlerin salınımına önderlik eden genetik düzenleme genellikle Nükleer Faktör Kappa-B (NF- κ B) transkripsiyonuna bağlıdır (40). Nükleer Faktör Kappa-B ailesi pek çok immün ve enflamatuvar cevabı kontrol eden çok çeşitli gen ekspresyonunun koordine edilmesinde merkezi bir role sahip olup, hücresel seviyede enflamasyon için en önemli tetikleyici olarak gösterilmektedir (51). Mikroorganizmaların uygun hücrelere tanıtılmasının ve sunulmasının ardından doğal immünitinin sitokinleri olan Tümör Nekrozis Faktör- α (TNF- α), İnterlökin 1 β (IL-1 β) ve İnterlökin 6 (IL-6) periodontal patogeneizde görülen ilk sitokinlerdir (52). Bu sitokinler enflamatuvar hücre migrasyonu ve osteoklastogenezisten sorumludur (40).

Prostaglandin E₂ (PGE₂) alveoler kemik rezorpsiyonuna yol açan etkili bir stimülatördür. Esas olarak makrofaj benzeri hücrelerde lokalize olan PGE₂, LPS'ler

tarafından uyarıldığında salınır. IL-1 β , TNF- α ve paratiroid hormon uyarısı PGE₂ salınımını artırır, bu da alveoler kemik yıkımında artışa sebep olur (40).

MMP'ler ise ekstraselüler matriksteki ya da hücre plazma membranındaki proteinlerin yıkımından sorumludurlar. Fibroblastlar, keratinositler, nötrofiller, makrofajlar ve endotelial hücreler MMP'lerin ana kaynağıdır. Çok sayıda *in vitro* çalışma IL-1 β , TNF- α , PGE₂ ve bakteri ürünlerinin MMP'lerin üretimini düzenlediğini göstermiştir (53). TNF ligand ve reseptör ailesinin üç anahtar molekülü olan Osteoprotegerin (OPG), Reseptör Aktivatör Nükleer Kappa B (RANK) ve Reseptör Aktivatör Nükleer Kappa B Ligand (RANKL) hormonlar ve sitokinlerle beraber kemik rezorpsiyonundan sorumlu diğer proteinlerdir (57).

Sonuç olarak, periodontal hastalıklarda mikrobiyal etiyolojik faktörler enflamatuvar olaylara aracılık eden bir dizi konak cevabını uyarırlar. Fizyolojik enflamasyonda hücreler, mediyatörler ve dokular arasındaki bu ilişki iyi bir şekilde düzenlenmiştir. Ancak duyarlı bireylerde enflamatuvar ve immün yanıt arasındaki dengesizlik kronik enflamasyon, doku hasarı ve hastalıkla sonuçlanır. Bu yüzden enflamatuvar ve immün cevabı bir bütün olarak değerlendirmek gerekir. Bu bakımdan doku yıkımına sebep olan karmaşık olayların anlaşılması geliştirilecek tedavi stratejileri açısından büyük önem taşımaktadır (40, 55) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Periodontal hastalık patogenezindeki immünolojik faktörler

2.2.1. Nükleer faktör Kappa B (NF-κB) ve aktivasyon mekanizması

NF-κB, DNA transkripsiyonunu kontrol eden bir protein kompleksidir ve hemen hemen tüm hayvan hücre tiplerinde bulunur (56). NF-κB aktivitesi İnhibitör Kappa B (IκB) ailesi üyeleriyle direkt ilişkilerle düzenlenir. Uyarılmamış hücrelerin sitoplazmasında, IκB inhibitör proteinleri non-kovalent etkileşimler yoluyla NF-κB alt ünitelerini ayrı ayrı halde tutar ve böylece NF-κB'nin sitoplazmada inaktif olarak kalmasını ve çekirdeğe geçmesini engeller (57). RANKL; stres, sitokinler, serbest radikaller, ultraviyole ışın, okside düşük yoğunluklu lipopolisakkarit (LDL, Low Density Lipopolisakkarit) ve bakteriyel ya da viral antijenler gibi uyarılara karşı oluşacak cevapta hızlı bir şekilde aktive olur ve çekirdeğe geçer. Hücre içi aktivasyonunu takiben DNA'da kendisine özel sahalara bağlanan NF-κB başta TNF-α ve IL-1β gibi sitokinler olmak üzere, büyüme faktörlerini, kemokinleri, MMP gibi proteinazları veya hücresel reseptörleri kodlayan pek çok genin ekspresyonunu düzenler ve böylece uyarılara karşı hücresel cevabı modüle eder. Ayrıca enfeksiyona karşı immün cevabın düzenlenmesinde anahtar rol oynayan NF-κB, özellikle proenflamatuvar sitokinlerin primer uyarıcısı olarak kabul edilir (58).

2.2.2. Reseptör Aktivatör Nükleer Kappa B (RANK)

RANK, 616 aminoasitten oluşan bir transmembran proteindir. Osteoklastik öncühücreler, B ve T hücreleri, dendritik hücreler ve fibroblastların da dahil olduğu monosit/makrofaj sisteminde bulunur (59). RANK esas olarak iskelet kasları, timüs, karaciğer, kolon, ince bağırsak, adrenal bez, osteoklastlar, meme bezi epitelyal hücreleri, prostat ve pankreasta eksprese edilir. Enfeksiyona karşı immün cevabı düzenlemede anahtar rol oynayan NF-κB'nin aktivasyonu en çok RANKL aracılığıyla olur ancak RANK'ın aşırı ekspresyonu NF-κB yolağını aktive etmek için yeterli bir uyarandır (60). RANK, osteoklastogenezis ve Ca^{+2} metabolizmasını kontrol eder ve preosteoklastlara RANKL'in bağlanmasını sağlayan tek reseptördür. RANKL ve RANK reseptörü arasındaki bu bağlanma, osteoklast formasyonu ve aktivasyonunu indüklemektedir (61).

2.2.3. Reseptör Aktivatör Nükleer Kappa B Ligand (RANKL)

Kemik kütlesi osteoblast ve osteoklastların birlikte çalışması ile belirlenir. Osteoblastlarda bunu belirleyen temel iki yolak ise RANKL/RANK ve Wnt/ β -katenin sistemidir (62). Normal ve patolojik durumlarda kemik yıkımının anahtar mediyatörü olan RANKL, TNF ligand ailesinin bir üyesidir. RANKL; osteoblastik, stromal, aktive olmuş B ve Th hücreleri tarafından üretilir (63,64). RANKL; osteoklast formasyonu, füzyonu, aktivasyonu ve sürekliliği için temel faktördür, bu da kemik rezorpsiyonu ve kaybına sebep olur. RANKL, osteoklastlar ve dendritik hücrelere lokalize olmuş reseptörü olan RANK'ı ve sinyal zincirini aktive eder (61). Etkileri bir tuzak reseptörü olan OPG ile engellenmektedir (65).

Çözünür iki izoformu bulunmaktadır: 1) Tip II Membran Proteini (mRANKL) 2) Sitoplazmik ve Transmembran Yapısından Yoksun Salgı Molekülü (sRANKL). Her iki form da bioaktif olmasına rağmen mRANKL bağlantısı homeostatik gibi görünürken, sRANKL sinyal üretimi patolojik ya da nonfizyolojiktir (66). Ayrıca RANKL osteoblastik hücreler tarafından üretilirse mRANKL, aktive olmuş T hücreler tarafından üretilirse sRANKL oluşur (67). RANKL sentezi hormonlar (1,25-dihidroksi vitamin D3 gibi), büyüme faktörleri ve peptidler (Transforme Edici Büyüme Faktörü, Transforming Growth Factor β -1; TGF- β 1, Fibroblast Büyüme Faktörü-2 ve PTH ilişkili protein), sitokinler (IL-1 β , IL-6, IL-11 ve TNF- α) ve glukokortikoidler gibi pek çok faktör tarafından düzenlenir. Ayrıca osteoblast/stromal hücrelerde RANKL sentezi, osteoklast oluşumu ve aktivasyonunu uyaran faktörler ile de uyarılır (60, 67, 68).

2.2.4. Osteoprotegerin (OPG)

1997 yılında iki farklı araştırma grubu tarafından, kemik yıkımını engelleyen ve OPG olarak isimlendirilen yeni bir protein bulunmuştur. TNF reseptör ailesinin bir üyesi olan OPG, osteoblastlar ve kemik iliği hücreleri tarafından salgılanan bir glikoproteindir (57, 59). OPG, RANKL'a yüksek afinite ile bağlanabilen bir tuzak reseptörü olarak görev yapar. Çözünür bir moleküldür ve RANKL'ın RANK a bağlanmasına engel olur. Böylece osteoklast farklılaşmasını ve kemik rezorpsiyonunu engeller (69). Yani hipokalsemik ve antirezorptif etkilidir.

OPG, osteoblastlar dışında kardiyovasküler sistem (kalp, arter ve venler) dahil, böbrek, karaciğer, dalak, beyin, akciğer ve kemik iliği gibi pek çok doku, hematopoetik ve bağışıklık sistemi hücreleri tarafından sentezlenir (67, 68, 70). Osteoprotegerinin kemik dokudaki etkilerinin haricinde, immünolojik yanıtın düzenlenmesinde de rolü vardır. OPG, dendritik hücreler ve T hücreleri arasındaki RANK-RANKL bağlantısında rol oynayarak, dendritik hücrelerin immünoestimülatör kapasitelerinin ve T hücre proliferasyonunun artmasını sağlar. OPG, etkin antikor yanıtın oluşmasında ve B hücrelerinin olgunlaşmasında da önemli role sahiptir (71). OPG sentezi lokal ya da sistemik olarak hormonlar, bakteriyel ve enflamatuvar ürünler tarafından düzenlenir (72).

Tüm bu bilgiler ışığında kemik remodelasyonunun RANK-RANKL bağlantısı ve OPG arasındaki denge tarafından kontrol edildiğini söylemek mümkündür.

2.3. Kemik yapısı

2.3.1. Kemik homeostazi ve korunması

Kemik mekanik, beslenme ve hormonal etkilere cevapta sürekli yenilenmeye devam eden son derece dinamik ve aktif bir dokudur. Sağlıklı yetişkinlerde osteoklastlar tarafından gerçekleştirilen kemik kaybı ve osteoblastlar tarafından gerçekleştirilen kemik yapımı sürecindeki çift taraflı denge için homeostaz gereklidir (73, 74, 75, 76). Fizyolojik koşullar altında, bu süreçler sistemik hormonlar ve lokal faktörler tarafından dikkatlice düzenlenmekte ve osteositler ve plazma Ca^{+2} seviyeleri ve dokular arasında bulunan sıvıdaki kemik benzeri hücreler tarafından planlanmaktadır. Kemik rezorpsiyonu serum Ca^{+2} seviyeleri ve iskelet homeostazında büyük rol oynamaktadır ve osteoblastlar tarafından yeni kemik yapımı ile rezorpsiyonun çift taraflı düzenlenmesi büyüme, remodeling ve iskelet korunması için gereklidir (74, 75, 76).

2.3.2. Kemik hücreleri

Preosteoblastlar, osteoblastlar, osteositler ve kemik benzeri hücrelerin hepsi osteojenik benzeri hücrelerden oluşmaktadır. Bu osteojenik benzeri hücreler de sırasıyla kemik iliği stromasındaki primitif mezenşimal hücrelerden ve bağ dokusu kan damarlarına komşu perisitlerden oluşmaktadır. Bunların değişimi için Osteokalsin (OCN), kemik sialoprotein (Bone Sialoprotein, BSP), Osteopontin (OPN) salınımı ve kollajen sentezini aktive eden *Osf2/Cbfa* geninin aktivasyonu gerekmektedir ve kemik morfogenetik protein- (Bone Morphogenetic Protein, BMP-) 2 ve transforme edici büyüme faktörü beta (Transforming Growth Factor beta, TGF- β)’dan uyarılar ile devam etmektedir (77, 78). Kemik yapımındaki birincil rollerinin yanısıra osteoblastlar; kemokinleri, prostoglandinleri ve büyüme faktörlerini (BMPs, TGF- β , koloni-uyarıcı faktör-1 (Colony-Stimulating Factor, CSF-1), granülosit koloni uyarıcı faktör (Granulocyte Colony-Stimulating Factor, G-CSF) 1, temel fibroblast büyüme faktörü (basic Fibroblast Growth Factor, basic FGF, FGF₂), vasküler endotelial büyüme faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) ve insülin-benzeri büyüme faktörü (Insulin-like Growth Factor, IGF)) osteoklastik hücreler ile birlikte osteojeniteyi düzenleyen otokrin, kendi kendini düzenleyen ve/veya parakrin aktivite ile salmaktadır (79). Osteoblastik hücrelerin rezorpsiyonun yeri, başlaması, uyarılması ve önlenmesi süresince osteoklastların çevresel cevabı üzerinde büyük etkileri vardır (75, 80).

bFGF, (FGF₂), 20’den fazla farklı FGF proteinin içinde bulunduğu heparin bağlayıcı büyüme faktörleri ailesinde yer alır ve 16,5 kDA molekül ağırlığına sahiptir (81,82). bFGF, hücre düzeyinde etkisini fibroblast büyüme faktörü reseptörlerine (FGF-R) bağlanarak gerçekleştirir. Büyüme faktörü ve reseptörünün bağlanmasından sonra reseptörde otofosforilasyon olayı ile aktivasyon gerçekleşerek transkripsiyonu düzenleyici proteinler uyarılır (81). bFGF; endoderm, mezoderm ve ektoderm kökenli birçok hücrenin proliferasyonunu ve farklılaşmasını etkileyen bir büyüme faktörüdür. bFGF; yeni damar oluşumunu, hücre çoğalmasını ve kollajen dışı protein sentezini artırarak yara iyileşmesini etkiler. bFGF; osteoprogenitör hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını sağlayarak fonksiyonel osteoblastların sayısını artırır (82). bFGF kemik matriksi bileşenlerinden birisidir ve hücre kültürü

ortamında osteoblastlardan salındığı gösterilmiştir. bFGF, kemik dokusunun gelişimi, büyümesi, yeniden şekillenmesi ve tamirinde rol oynar (81). bFGF ayrıca; TGF- β , VEGF, IGF gibi büyüme faktörlerinin salınımını artırarak indirekt olarak da etki gösterir (83). bFGF'nin osteoblastik hücreler üzerinde farklılaşmayı ve mineralizasyonu arttırıcı etkilerinin yanı sıra inhibe edici etkisi de bildirilmiştir. bFGF'nin osteoblastik hücreler üzerindeki çift yönlü etkisi FGF-R'lere bağlanmalarında yarıştıkları sindekanların dokulardaki varlığına ve salınımlarını etkiledikleri diğer sitokinlere bağlı olabileceği öne sürülmüştür (82). bFGF periodontal ligament hücrelerinin proliferasyonunu doza bağımlı olarak artırırken, alkalen fosfataz aktivitesini inhibe etmektedir. Periodontal ligament hücrelerinin FGF-R düzeyinin, bFGF'nin bu hücre üzerindeki etkilerinin belirlenmesinde rol oynayabileceği düşünülmektedir. bFGF'nin periodontal ligamentin tamiri sırasında farklılaşmayı inhibe ederken anjiyogenezi artırarak ve olgunlaşmamış periodontal ligament hücrelerinin gelişmesini sağlayarak yara iyileşme sürecinde önemli bir rol oynadığı ileri sürülmektedir. Beagle köpeklerinde oluşturulan deneysel periodontal defektlerin tedavisinde kollajen jel taşıyıcı ile uygulanan bFGF'nin alveol kemiğine tutunmuş periodontal ligament ve sement oluşumunu önemli düzeyde arttırdığı bildirilmiştir (84).

Hakkı SS ve ark. (85)'ları, yaptıkları *in vitro* çalışmada b-FGF'nin sementoblast hücrelerinin mitotik aktivitesini arttırdığını, OCN, BSP ekspresyonunu azalttığını ve mineralizasyonunu inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Fakhry A ve ark. (86)'ları da kısa süreli veya aralıklı b-FGF ile muamele edilen osteoblastların mineralize doku oluşturma kapasitelerinin arttığını ve bFGF uygulamasının BMP-2 ve TGF- β gibi osteojenik faktörlerin ekspresyonunu arttırdığını da göstermişlerdir. bFGF; çok sayıda hücre, doku ve organ sistemlerinin fonksiyon ve gelişiminde etkili olan bir büyüme faktörüdür. Bu sistemler Tablo 2.2'de özetlenmiştir (87). Endotel hücre çoğalması, göç etmesi ve yeni kan damarı oluşumunun uyarılması bFGF'nin en iyi karakterize edilen fonksiyonlarındanıdır.

Tablo 2.2. Farklı organ sistemleri üzerine bFGF'ün fonksiyonları

Organ	Fonksiyonlar
Beyin	Sinir hücre farklılaşması ve yaşaması
Kan damarları	Damar gelişimi (anjiyogenez), düz kas hücre çoğalması, kan basıncı kontrolü
Akciğer	Nefes yollarının morfogenez, fibrozit
Kol ve bacaklar	Kol ve bacak gelişimi
Kas	Miyojenez
Kemik	Kemik iyileşmesi, kırık dokunun oluşumu
Hematopoez	Granülositlerin oluşumu, megakaryosit oluşumu ve kök hücre yaşamının uyarılması
Üreme sistemi	Spermatogenez
Göz	Fotoreseptör yaşamı
Deri	Melanojen, doku tamiri, keratinosit morfojen

Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) aynı zamanda Vasküler Permeabilite Faktörü (VPF) olarak da isimlendirilmekte olup, 1989 yılında bulunmuş ve tanımlanmıştır. Dört tane izoformu bulunmaktadır ve VEGF ailesinin en aktif üyesi VEGF-A'dır. Diğer izoformlardan VEGF-B'nin işlevi henüz bilinmemektedir. VEGF-C ve VEGF-D ise esas olarak lenfanjiyogenezde rol oynamaktadır (88). Bu faktörlerden VEGF-A, anjiyogenez ve endotel hücrelerinin gelişimden sorumlu olan faktördür. İnsanda VEGF geni, alternatif bölünme vasıtası ile biyolojik olarak en yüksek aktiviteye sahip olan 165 aminoasitlik VEGF peptid dizisini sentezlemektedir (89). VEGF vücutta endotel hücreleri, makrofajlar, fibroblastlar, düz kas hücreleri, osteoblastlar ve hipertrofik kondrositler tarafından üretilmektedir (90, 91). Etkisini diğer peptid yapılı büyüme faktörlerine benzer şekilde, hedef hücrelerdeki yüzey reseptörlerine (VEGFR-1 ve VEGFR-2) bağlanarak göstermektedir (89). Bilinen en kuvvetli anjiyogenez uyarıcısıdır. Kendi salınımından sonra FGF gibi diğer büyüme faktörlerinin salınımını uyarır. Anjiyogenezin ilk basamaklarından vasküler bazal membranların yıkılması için gerekli kollagenaz ve jelatinazın indüksiyonuna, daha sonra yine anjiyogenez için gerekli olan α integrinlerin ekspresyonuna neden olarak iyileşen dokuda anjiyogenezi başlatır. Vasküler geçirgenliği artırır, fibroblast, enflamatuvar ve endotelial hücrelerin proliferasyon ve göçünün uyarılmasında görevlidir. Deneysel modellerde, ekstremitte iskemisinde egzojen olarak verilen VEGF'in anjiyogenezi başlattığı, vasküler yaralanma sonrası uygulandığında yeniden endotel oluşumunu arttırdığı gösterilmiştir (92). Doğrudan mitotik etkisinin yanında, VEGF bir taraftan kısmen nitrik oksit (NO) sentezini uyarak vazodilatasyona neden olurken, diğer taraftan hücre göçünü ve apoptozu inhibe eder. Yara iyileşmesinde

önemli rol oynayan fibroblast, enflamatuvar ve endotelial hücrelerin proliferasyon ve göçünün uyarılmasında görevlidir ve vasküler geçirgenliği artırır. Deneysel modellerde ekstremite iskemisinde egzojen VEGF'in anjiyogenezi başlatarak vasküler kaynağı, bazı çalışmalarda da vasküler yaralanmanın ardından uygulandığında yeniden endotel oluşumunun arttığı gösterilmiştir (93). VEGF kemik iyileşmesi bölgesine osteoblastlar, osteoklastlar ve mezenkimal hücrelerden yoğun olarak salınmaktadır. İnsan vücudundaki osteoblastların yüzeylerinde yüksek seviyelerde VEGFR-1 bulunmaktadır. Osteoblastların bu reseptörler üzerinden uyarılmaları kuvvetli bir kemotaktik yanıt oluşturmaktadır (94). Bununla beraber VEGF, kendi tarafından uyarılan endotel hücrelerinden salınan endotelin-1 ve IGF-1 gibi osteoanabolik faktörler aracılığı ile dolaylı olarak osteoblast öncüllerinin gelişimi ve farklılaşmasını uyarmaktadır. VEGF'nin ayrıca mezenşimal kök hücre kemotaksisini de arttırdığı gösterilmiştir (95). Periost, kas, yağ doku ve kemik iliği gibi dokular, sadece osteoblastlara farklılaşabilme kapasitesine sahip mezenkimal kök hücreler için zengin birer kaynak olmakla kalmayıp damar oluşumunu sağlayan öncül endotel hücrelerini de bünyesinde bulundurlar. Büyük oranda lokal ve sistemik VEGF artışı ile uyarılan anjiyogeneze sayesinde osteojenik substratları perisit kök hücreleri büyümekte veya iyileşmekte olan kemik dokuya taşınmaktadır (96). Bunun sonucu olarak da osteoblast ve endotel hücreleri arasında çift yönlü ve pozitif bir etkileşim ortaya çıkmaktadır. VEGF sadece doğrudan etki ile değil, diğer faktörlerle de (Örn: BMP) sinerjistik etkileşim içinde bulunarak anjiyogeneze ve yeni kemik oluşumunda önemli rol oynamaktadır (97).

Osteositler, kemik matriksinde bulunan sistemik gereksinimlere cevapta vücut sıvıları ile değişim ve taşınma için matriksten Ca^{+2} harekete geçiren matür kemik hücreleridir (98). Osteositlerin sistemik etkilere cevap oluşturduğu artan siklik Adenozin Mono Fosfat (cyclic Adenosine Monophosphate, cAMP) seviyeleri ile kanıtlanmıştır ve lokal kemik remodeling aktivitelerini düzenlemek için transdüser olarak kullanılmaktadırlar (98). Osteositler kemik rezorpsiyonu sırasında osteoklastlar tarafından serbest bırakılmaktadır. Kemik benzeri hücreler osteoklastlardan kemik yüzeyini korumakta, kemik sıvısının iyonik kompozisyonunu ve yeni kemik oluşumu ve yıkımını düzenlemektedirler (74, 76).

Osteoklastlar yüksek oranda hematopoetik kök hücrelerden kaynaklanan, hareketli, göç eden, kemik rezorptif hücrelerden özelleşmişlerdir (61, 74, 75, 76, 99). Osteoklastlar mineralize kemiğin parçalanmasından sorumludur ve bu nedenle normal iskeletin büyüme ve gelişimi, hayat boyunca kemik yoğunluğunun korunması, remodeling sırasındaki Ca^{+2} metabolizması, homeostaz ve tamir için çok önemlilerdir (74, 76, 99). Osteoklastlar birincil kemik rezorptif hücrelerdir, bunların aktivitelerinin lokal uyarımı alveolar kemik kaybı için temel ihtiyaçtır (100). Osteokalsin içeren mineralize kemik partiküllerine temas ve Monosit-CSF/CSF-1, RANKL, ILs, TNF gibi anahtar faktörlere cevapta, hematopoetik prekürsörler koloni oluşturucu hücrelerden kaynaklanan monosit ve makrofajlara farklılaşabilir, periferel kan monositleri ve doku makrofajlarına dönüşebilir ve son olarak matür multi-selüler osteoklastlara dönüşebilmektedir (61, 99, 101, 102, 103, 104).

Preosteoklastların uyarılmasındaki ilk olaylardan biri, Paratiroid hormonu (PTH), retinoik asit ve vitamin D3 uyarımı gibi lokal ve sistemik etkilere cevapta osteoblast aktin ve miyozin hücre iskeletinin kontraksiyonudur (63, 80). Bu durum hücreler arası boşluğun genişliğini arttırmaktadır, böylece dokular arası sıvıya daha fazla osteoid bırakılmaktadır. Osteoblastlar aynı zamanda kollajenaz ve plazminojen aktivatörü de salgılamaktadırlar (105). IL-1, TNF ve epidermal büyüme faktörünün (Epidermal Growth Factor, EGF) osteoblastları deaktive ettiği ve CSF-1 ve RANKL salınımını arttırdığı gösterilmiştir (98, 103).

2.3.3. Kemik remodelinginin hücresel mekanizmaları: Yıkım ve oluşum

Kemik remodeling döngüsü, osteoklastlar tarafından sürekli uzaklaştırılan matür kemiğin osteoblastlar tarafından eş zamanlı oluşturulan yeni kemik ile yer değiştirmesi sonucu durmaksızın çalışmaktadır (76). Bu durum iskeletin her yerinde kemik remodeling uniteleri (bone-remodelling units, BRU) olarak isimlendirilen fokal ünitelerde meydana gelmektedir. Her ünitenin aktivitesi 3-4 ayda tamamlanmaktadır. Bu çok basamaklı süreç aktivasyon, rezorpsiyon, reversal ve formasyon şeklinde dört fazda fonksiyon görmektedir.

Aktivasyon fazı, dinlenme halindeki kemik yüzeyini remodeling yüzeyine dönüştüren başlangıç olayıdır (74, 99). Bu süreç kemik yüzeyine mononükleer

osteoklast prekürsörlerinin alımını, bunların farklılaşmasını ve fonksiyonel osteoklastlara dönüşümünü içermektedir (80). Terminal farklılaşma ve mononükleer hücre füzyonu; osteoklast progenitörleri ve osteoblastlar/stromal hücreler arasındaki hücre-hücre etkileşimleri ve özellikle OCN aracılığıyla mineral faza temas ile olmaktadır (63, 103). Hem CSF-1 hem IL-1 preosteoklast füzyonunu uyarmaktadır (104). E-kadherin preosteoklastların füzyonu ile ilişkili hücre-hücre adezyonu için önemlidir. Mineralize kemik matriksini çevreleyen non-mineralize osteoid, osteoklastlar mineralize matrikse bağlanmadan ve rezorpsiyon başlamadan önce çözünmelidir (80). Osteoblast proteazlar bu osteoidin çözülmesinden sorumludur. Bunun sonrası, aktive olan osteoklastlar kemik matriksine bağlanmakta, sitoskeletleri yeniden düzenlenmekte ve polarize bir morfoloji kazanmaktadırlar. Rezorpsiyon alanını izole etmek için kapama zonu oluştururlar ve proteaz enzimlerini salgılayan dalgalı sınır (ruffled border, RB) geliştirirler (76, 99).

Rezorpsiyon fazı sırasında, kemik matriksinin organik komponentlerini ve mineralleri uzaklaştırmak için osteoklastlar uyum içinde çalışmaktadırlar (76). Rezorpsiyon yüzeyinin özelliği scallop erozyon şeklinde görünmektedir, bunlara da Howship ya da rezorpsiyon lakünleri denilmektedir (74, 99). Rezorpsiyon fazı ortalama 8-10 günde sonlanmaktadır, bu süre de tahmini osteoklastların yaşam süresine denk gelmektedir (76).

Rezorpsiyon fazından sonra mineral ve organik matriksin çoğu çözülmüştür ve yıkımdan tamire geçişi gösteren 7-14 gün sonra tamamlanacak olan reversal faz başlamıştır. Bu fazda, rezorpsiyondan formasyona geçiş yer almaktadır (77). Bir rezorpsiyon lakünü tamamlandıktan sonra, osteoklast kemik yüzeyi boyunca hareket edebilir ve tekrar rezorpsiyona başlayabilir ya da apoptozise gidebilmektedir (76).

Çok sayıda parakrin ve otokrin kimyasal sinyalizasyon faktörleri remodeling, rezorpsiyon, proliferasyon ve geçişin tüm aşamalarında yer almaktadır. Geçiş faktörleri osteoklastlar ile oluşturulan asidik çevrede rezorpsiyon sırasındaki bağlayıcı proteinlerden salınmaktadır ve sonrasında osteoklast formasyonu baskılanarak ve osteoblastogenezis uyarılarak negatif geri bildirim aracılığı ile rezorpsiyon önlenmektedir (98, 106, 107). Böylece lokal olarak kontrol edilen oto-düzenlenmiş hücre aktivasyon olayları dizisinde, 10 günlük osteoklastik rezorpsiyon

fazı genellikle 3 aylık formasyon (tamir) fazı ile devam etmektedir. Tamir sırasında; kemotaksis, hücre ataşmanı, mitoz ve osteoblast prekürsörlerinin farklılaşmasını içeren farklılaşma olayları ardı ardına yer almakta ve yeni kemik depozisyonuna neden olmaktadır (98).

2.3.4. Kemik oluşumu

Yeni kemik oluşumu, kısa reversal faz sonrası, osteoid depozisyonunu içeren 2 aşamalı süreç ile başlamaktadır. Başlangıç organik matriks birincil olarak Tip 1 kollajenden (%90) oluşmaktadır ve çeşitli diğer komponentler daha sonra yaklaşık 20 yıllık süreçte mineralize olmaktadır (98). Kalsifikasyonun nasıl gerçekleştiğini genellikle iki teori aydınlatmaktadır: Matriks Vezikül Teorisi ve Çekirdekleşme Teorisi. Her iki teorinin de katılan iskelet dokusunun tipine bağlı olarak paralel çalıştığı düşünülmektedir (73, 74, 108). Mineralizasyon süreci başladıktan sonra, mineral içeriği bir kaç günde final mineral içeriğinin %75'ine hızlıca yükselmektedir, matriks için maksimum mineral içeriğine ulaşmak 1 yılı bulmaktadır. Matür mineral fazın primer bileşeni hidroksiapatittir (98, 109, 110).

Non-kollajenaz kemik matriks proteinleri formasyon ve rezorpsiyon bağlantısı sırasında matriks mineralizasyonu, hücresel adezyon ve hücre aktivitesinin düzenlenmesinde anahtar rol oynamaktadırlar. Osteokalsin; bu proteinlerin en çok bulunanlarından biridir ve mineralizasyonda çok önemli role sahiptir, kemoatraktan olarak görev yapmaktadır ve osteoklast farklılaşması için gereklidir. Spesifik kemik proteini, yüksek Ca^{+2} bağlama potansiyeline sahiptir, böylece mineral depozisyonunu önlemektedir. Ayrıca bu protein, anahtar arjinin-glisin-aspartik asit peptit dizisi boyunca kemik matriks moleküllerine osteoklastların adezyonunu uyarmaktadır ve osteoklast formasyonunu düzenleyebilmektedir. Osteopontin ve osteonektin de osteojenik hücre aktivitesinde oldukça önemlidir (77, 78, 79,80).

2.3.5. Mineral ve organik matriksin parçalanması

Osteoklastlar hücre ve kemik yüzeyi arasında pH gradyanı meydana getirip osteoklast proteinazların mineral çözücü etkilerini destekleyerek rezorpsiyon lakünlerinde kemiği rezorbe etmektedir. Karbonik anhidraz (carbonic anhydrase,

CA) 2 lakün asidifikasyonu için protonların ana sitoplazmik kaynağıdır. Bu, karbondioksiti karbonat ve hidrojen iyonlarına iyonize olan karbonik aside hidrate etmektedir (74, 76, 98, 110, 109). Vaküoler tip proton pompası, V-ATPaz, CA2 ile oluşturulan protonları hücreler içi veziküllere taşımaktadır. Sonrasında bunlar taşınmakta, RB membranına bağlanmakta ve proton içeriği laküne salınmaktadır. Asidifikasyon sonrasında pasif potansiyel çalışan klorid taşıması ile tamamlanmıştır. RB'nin klorid kanalı CIC-7 olarak tanımlanmıştır ve endozomlar aracılığı ile proton pompası boyunca RB'ye taşınmaktadır (98, 108,109,111).

Bazolateral membran değiştiricileri Na^+ ve Cl^- HCO_3^+ , fizyolojik seviyelerde internal pH'ı korumaktadır. Kalmodulin, RB'ye komşu osteoklast sitoplazmasında konsantre olmuş sitoplazmik Ca^{+2} bağlayıcı protein, RB'ye karşı ATP-bağımlı proton taşınmasını ve hücre içi Ca^{+2} 'un etkilerini düzenlemektedir. Rezorpsiyon devam ederken, sitoplazmik Ca^{+2} 'daki artış osteoklastları deaktive etmektedir, RB kaybı ve kemik matriksinden hücre kopması başlamaktadır (98, 109, 111). Hidroksiapatit çözünmesi, lizozomal enzimler, kemik-kaynaklı kollajenazlar ve proteazlar tarafından ekspozite organik matriksin sindirimi ile devam etmektedir (76, 105). Osteoklastlar her hücre tipinde yüksek konsantrasyonda mitokondri içermektedir; böylece Hidrojen (H^+) iyonlarının karbonik anhidraz-katalaz üretimi için gerekli ATP'yi oluşturmaktadır (109).

Parçalanma ürünleri transsitoz ile uzaklaştırılmakta ve son olarak hücre dışı boşluğa salınmaktadır. Özel enzim olan tartarat-dirençli asit fosfataz (Tartrate-Resistant Acid Phosphatase, TRAP) sitoplazmik veziküllerde bulunmaktadır, endositoza uğramış materyalleri yok etmek için transsitotik veziküllere bağlanmaktadır. Osteoklastlar rezorpsiyon lakünlerinden uzaklaştığı zaman, fagositler debrisini temizlemekte ve osteoblastlar yeni kemik oluşturmak için bölgeye gelmektedirler. RB altındaki asidik mikroçevrede mineral fazın çözülmesi Katepsin B, Katepsin E, Katepsin K, Katepsin S ve Katepsin L'nin enzimatik atakları ile kollajen fibrilleri açığa çıkartmaktadır. Bu sistein proteazları 4.5 asidik pH'da doğal kollajeni parçalamak için osteoklastlar tarafından salgılanmaktadır (98). Daha sonra jelatinaz A (MMP-2), stromelisin (MMP-3) ve kollajenaz (MMP-1) gibi MMPs, matriks parçalama sürecini devam ettirmektedirler. Bu nedenle kalmodulin

antagonistleri ve MMP inhibitörleri rezorptif kompartmanın asidifikasyonunu engelleyerek rezorpsiyonu bloke edebilirler (98, 105).

2.3.6. Osteoklastik kemik rezorpsiyonunun düzenlenmesi

Kemik rezorpsiyon hızı hematopoetik prekürsor havuzdan osteoklastların farklılaşma seviyesiveya matür hücrelerin rezorpsiyon, migrasyon ve ataşman aktivitelerini kontrol eden anahtar fonksiyonel proteinlerin düzenlenmesi vasıtasıyla ayarlanabilmektedir (80, 110, 74, 61). Kemik rezorpsiyonuna katılan çoğu hücreyel olayının *in vivo* ve *in vitro* kemik hücreleri üzerinde oldukça güçlü etkileri olan lokal osteotropik faktörler grubu tarafından düzenlendiği kanıtlanmıştır. Bu sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin çoğu lokal etkilerinde anlamlı fazlalık ve pleitropi veya çakışma ortaya koymaktadır (79, 98).

Hastalık durumunda, fonksiyonel kemik döngüsü için gerekli olan hemostatik dengedeki bozukluk yıkıcı osteolitik süreç ile sonlanmaktadır. Enflamatuvar periodontal hastalıklarda, hem mikrobiyal hem de konak-kaynaklı faktörler kemik rezorpsiyonu ve remodeling sürecine katılmaktadır (80, 106, 112). Bu kimyasal modölatörler fazlaca kompleks role sahiptir ve genellikle çeşitli hücre tiplerini içermektedir. Bazı faktörler direkt olarak osteoklastik hücreler üzerine etkilidir, bazıları ise lokal çevrede diğer hücre tipleri ya da ilave faktörlerin sekonder üretimi aracılığıyla indirekt olarak görev almaktadır (79).

Sitokin düzenlenmesi, kortikal kemik yerine sitokinden zengin iliğe daha yakın olan trabeküler kemik için oldukça önemlidir (73, 98). IL-1, IL-6, TNF- α gibi çoğu güçlü osteotropik sitokinler, kemik hücreleri üzerindeki etkileri yanı sıra vücuttaki çok sayıda etkiye aracılık etmektedir (98). Osteoblastlar tarafından üretilen sitokinler bakteri ve LPS ile beraber çeşitli hormonlar ve sitokinler tarafından düzenlenmektedir (98, 104). Bunlar aynı zamanda kemik homeostatik dengeyi etkilemek için lokal faktörler ile sinerji içerisinde görev almaktadır (99). Böylece hormonlar, büyüme faktörleri ve sitokinler farklılaşma, aktivasyon, yaşam süresi ve fonksiyonların düzenlenmesi ile osteoklast aktivitesini düzenlemektedir. Bunlar PTH, kalsitriol, PTH-salınan protein, PGE₂, tiroksin ve IL-3'ü içermektedir (73, 98).

Proenflamatuvar sitokinler (IL-1 ve IL-6, TNF) periodontitiste osteoklastik rezorpsiyonun uyarılmasına katılmaktadırlar. İmmünoregülatör sitokinlerin (IL-2 ve IL-4, interferon gama (IFN- γ)) fonksiyonları çok az açıklanmıştır, ama bu sitokinlerin düşük seviyeleri periodontitise katkıda bulunabilmektedir. Genetik faktörler kemik mineral yoğunluğunun kontrolünde %80'in üzerinde hesaplanmıştır, böylece varyasyonların belirlenmesinde büyük bir rol oynamaktadır. Ancak, rezorpsiyon hızından ziyade kemik oluşum hızı bu genlerden etkilenmektedir (98, 106, 112). Bazı katılımcılar sadece patojen bakteri varlığı ile tamamen açıklanamayan, proenflamatuvar ve kemik rezorptif sitokinlerin yüksek seviyelerini ve agresif kemik yıkımını göstermektedir (98). Anahtar immün ya da enflamatuvar düzenleyici faktörlerin genetik varyasyonları, basit-nükleotid polimorfizmleri olarak isimlendirilen, periodontal hastalığın agresif formlarının familyal agregasyonu gibi periodontal hastalığın klinik tablosundaki bu varyasyonları açıklayabilmektedir (98).

Kemik rezorpsiyonu üzerinde sistemik etkiler; PTH, IL-1, TNF, doku uyarıcı faktör (Tissue Growth Factor, TGF) ve 1,25-dihidroksivitamin D₃'ü içeren çeşitli mediyatörler tarafından oluşturulabilir. Bu faktörler kollajenaz, doku plazminojen aktivatörü ve RANKL salınımına ve sitoplazmik kasılmaya neden olmak için osteojenik hücreleri direkt olarak etkileyerek, osteoklast sayısı ve aktivitesine etki edebilmektedir. PTH'nin C-terminal parçası osteoblast varlığında osteoklast oluşumu ve aktivitesini arttırmaktadır ve osteoblast yokluğunda hematopoetik prekürsörlerden osteoklast-benzeri hücrelerin oluşumunu hızlandırmaktadır. Kalsitonin, IFN- γ ve TGF- β osteoklastik aktivite ve farklılaşmanın güçlü inhibitörleridirler (6, 105, 113, 114). PTH ve kalsitonin hormonları kemik hücreleri gibi normal fizyolojik seviyelerde bağırsak emilimi ve böbrek atılımı üzerindeki görevleri ile kan Ca⁺² konsantrasyonunun korunmasında birlikte rol almaktadırlar. Osteoklastlar üzerinde PTH'nin direkt etkilerini destekleyen kanıtlar olduğu gibi, indirekt mekanizmayı destekleyen kanıtlar da vardır. İndirekt mekanizmada PTH, RANKL salmaları için osteoblastları uyarmaktadır, sonrasında osteoklastlar uyarılacaktır. PTH aynı zamanda osteoblastlardan IL-6'nın üretimini de uyarmaktadır, IL-6 osteoklastik farklılaşmayı

arttırmaktadır ve osteoblastları küçültürken kemik yüzeyini rezorpsiyona daha duyarlı hale getirmektedir (98, 102, 111, 115).

Polipeptit kalsitonin hücrel Ca^{+2} ve cAMP'yi arttırmaktadır ve podozom bağlama yeteneğini değiştirerek ve RB boyutunu azaltarak açık zon sitoskeleti bozmaktadır. Kalsitonin proton çıkışı bloke etmektedir ve osteopontin salınımını azaltmaktadır; böylece 15 dakikalık uygulama içinde osteoklastların kemik yüzeylerinden ayrıldığı görülmüştür. Seks steroidleri osteoblast proliferasyonu ve farklılaşmasını uyararak, hem de IL-6 transkripsiyonunu azaltarak anabolik etki oluşturmaktadır. Post-menapozal kadınlarda artan osteoklastik rezorpsiyon ve azalan osteoblast proliferasyonu nedeniyle osteoporoz gözlenmektedir (98, 107, 109, 111).

2.3.7. Kemik rezorpsiyonunun lokal mediyatörleri

Osteoklastların lokal oluşumu ve bunların uyarılması alveoler kemik kaybı için gereklidir. IL-1, IL-6, IL-11, IL-17, TNF- α , TNF- β , TGF- β , kininler ve trombin gibi çoklu mediyatörler kemik rezorpsiyonunu uyarabilmektedir (76, 100, 106). Kemik rezorpsiyonu aynı zamanda direkt osteoklastik rezorpsiyonun sonucu olarak oluşan iyonize Ca^{+2} tarafından lokal olarak düzenlenmektedir. Bakteriyel LPSs gibi lipid mediyatörler, konak-kaynaklı platelet-aktif edici faktör ve PGEs de aynı zamanda kemik rezorpsiyonunun uyarılmasında yer almaktadır. Enflamasyon alanlarında bulunan reaktif oksijen araçları ve hücre dışı nükleotidler de rezorpsiyonda yer almaktadır (80).

Kemik rezorpsiyonunda makrofajlar ve T lenfositler tarafından oluşturulan lokal enflamatuvar mediyatörlerin rolleri kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Doku üzerindeki etkili fonksiyonları direkt ya da osteoblastlar tarafından uyarılan RANKL-üretim yolu gibi indirekt şekilde olabilmektedir. Böylece periodontitisteki alveolar kemik rezorpsiyonu hücrel enflamatuvar infiltratlar tarafından direkt ya da indirekt şekilde uyarılabilmektedir (100, 101, 106, 116).

Diş eti oluşu sıvısı (DOS) kompleks protein komponentleri içermektedir. Bu komponentler sadece gingival sulkusu irrite etmezler aynı zamanda oral kaviteye de salınırlar (117, 118). Diş eti oluşu sıvısı gingival kapiller yataktan (serum

komponentleri) ve hem yerleşik hem de göç eden enflamatuvar hücrelerden kaynaklanmaktadır. Bu sıvı, rolü bu ekolojik çevrede konak ve bakteri etkileşimlerine katkıda bulunmak olan doğal, enflamatuvar ve kazanılmış immün molekülleri ve hücre dizisini içermektedir (118). Çalışmalar DOS'un *in vitro* kemik rezorpsiyonunu uyarabilen mediyatörleri içerdiğini göstermektedir. Sorumlu primer faktör IL-1 α olarak görülmektedir, IL-1 β ve PGE₂ ile uyarılmada anlamlıdır. Bu eksüda, diagnostik ve prognostik potansiyeli ile, periodontal kemik rezorpsiyonunun biyolojik işaretleyicilerinden kaynaklanan ekstraselüler matriksin elde edilebilir kaynağıdır (79, 101, 119).

Diş eti oluşu sıvısı analizi hem sağlıklı hem de periodontal hastalıklı bireylerde hücre ve humoral cevapları gösterebilmektedir. Ancak DOS sitokin seviyeleri ve hastalık arasındaki ilişkinin direkt kanıtları olmasada, IL-1 α ve IL-1 β 'nın endotelial hücrelere monosit/makrofaj ve polimorfonükleer hücrelerin (PMN) bağlanmasını arttırdığı, PGE₂ üretimi ve lizozomal enzimlerin salınımını ve kemik rezorpsiyonunu uyardığı bilinmektedir (119). Diş eti oluşu sıvısındaki IFN- α varlığı periodontal hastalıkta koruyucu role sahip olabilir çünkü IL-1 β 'nın kemik yıkıcı aktivitesini engellemektedir (120). Piridinolin çapraz bağları kemik rezorpsiyonu için spesifiktir ve böylece aktif lezyonlarda kemik yıkımından gingival enflamasyonun farklılaşmasında yararlıdır (79).

2.3.8. RANKL ve OPG'nin rolleri

Osteoklastların aktivasyonu ve farklılaşması reseptör süper ailesi ve TNF ligandın üç üyesi tarafından kontrol edilmektedir: Osteoklastogenezisi başlatan RANKL, RANK ve OPG. Bu üç peptidin tanımlanması ile osteoklast farklılaşması ve aktivitesinin moleküler mekanizmalarının anlaşılmasına son derece katkıda bulunulmuştur (61, 101, 115, 116, 121, 122).

RANKL, TNF süper ailesinin bir üyesidir (aynı zamanda ODF, TRANCE, TNFSF11 olarak da bilinmektedir). RANKL, osteoblastlar veya stromal hücreler tarafından çözünür formda (sRANKL) ya da membrana bağlı protein (mRANKL) olarak ifade edilmektedir. RANKL osteoklast ve preosteoklast hücre yüzeyleri

üzerindeki reseptörü RANK'a bağlandığında, proliferasyon ve farklılaşmayı uyarak osteoklast oluşumunu desteklemektedir (61, 63, 102, 109, 122).

OPG, tuzak reseptörü, gezici proteindir, osteoblast ve kemik iliği stromal hücrelerini içeren çeşitli hücre tipleri tarafından üretilmektedir. OPG, mRANKL'a bağlanarak osteoklast oluşumunu engellemektedir. Böylece preosteoklastlar ile hücre-hücre etkileşiminin uyarılması önlenmekte ve RANK/RANKL etkileşimleri engellenmektedir. Bu üç protein osteoblast tarafından etkilenen osteoklast farklılaşması için önemlidir ve osteoblastlardaki RANKL ve OPG arasındaki denge yeni osteoklast üretimini direkt olarak etkilemektedir (1, 102, 107, 121, 122).

Gingival fibroblastlar ve ligamenti içeren diğer yerleşik periodontal hücreler de aynı zamanda kemik remodelingi ve rezorpsiyonun düzenlenmesine katılmaktadır. İnfiltrate olan lökositler IL-1 ve PGE₂ gibi enflamatuvar mediyatörleri üretmektedir. Bu mediyatörler osteoblastlar, periodontal ligament fibroblastlar ve gingival fibroblastlar tarafından salınan RANKL ve OPG'yi etkilemektedir. RANKL aynı zamanda aktive olmuş T hücrelerinden de salınmaktadır (64, 101, 102, 121, 123).

Yapılan çalışmalarda CSF-1/M-CSF ile kombinasyonlu sRANKL'ın reseptörüne bağlanarak periferik kan hücre prekürsörlerinden osteoklast gelişimini uyardığı gösterilmiştir. Osteoblastların CSF-1 üretiminden sorumlu olduğu ve osteoblast ve osteoklast prekürsörleri arasında temas sağladığı, böylece osteoklast gelişimini uyardığı belirtilmiştir (63, 104, 108, 114, 123).

RANKL reseptör aktivasyonu preosteoklastlar üzerindeki TRAP, β_3 integrin, katepsin K ve kalsitonin reseptörlerinin salınımını attırmaktadır. Monosit ve makrofaj hücrelerinin üzerindeki uygun reseptörler ile etkileşim yoluyla OPG osteoklastogenezisin negatif ve RANKL ise pozitif regülatörüdür. İlave olarak, osteoklastik rezorpsiyonun çoğu sistemik ve lokal regülatörü RANKL/OPG ve CSF-1 yolları aracılığı ile görev yapmaktadır (63, 101, 121, 122).

2.4. Periodontal Hastalığın İmmünopatogenezi

Kronik periodontal hastalıkta, bakteriyel plak içindeki biyolojik olarak aktif olan maddeler gingival yumuşak dokularda ve periodonsiyumda lokal enflamatuvar

cevabı uyarmaktadır (112). Enflamatuvar hücrelerin girişi ile PGE₂, IL-1 ve RANKL gibi konak sitokinleri üretilmektedir. Böylece primer kemik yıkıcı hücreler olan osteoklastlar aracılığı ile yıkım uyarılmaktadır. Patolojik enflamatuvar durumlarda, uyarılmış enflamatuvar hücre ürünleri osteoklast aktivitesini başlatmaktadır ve koruyucu ve yıkıcı süreçler arasındaki dengeyi bozmaktadır (61, 73, 76, 102, 115). Bu durum periodontal hastalığın immünopatogenezi olarak adlandırılmaktadır ve son on yılda bu alanda yapılan öncü araştırmalar ‘osteoinmünoloji’ olarak adlandırılan yepyeni bir alanın oluşmasına neden olmuştur (113, 124).

Periodontal hastalıkta, gingival bağ dokusu içindeki T hücreleri, B hücreleri, makrofajlar ve nötrofillerin hücrel enflamatuvar infiltratları, enflamatuvar mediyatörlerin salgılanmasındaki eşzamanlı artış ile artmaktadır (125). Bu enflamatuvar hücreler aynı zamanda osteoblastlar, periodontal ligament ve gingival fibroblastlar gibi stromal hücreler ile de etkileşmektedir. RANKL-aracılı osteoklastogenezis enflamatuvar kemik yıkımında önemli rol oynamaktadır ve RANKL salınımı periodontitiste artmaktadır (61, 101). Lenfositler RANKL üretirken, fizyolojik koşullar altında kemik rezorpsiyonuna katılmamaktadırlar. Ancak, enflamatuvar patolojik rezorpsiyon durumlarında, aktif T lenfositler sRANKL’ın aşırı üretimi ile kemik rezorpsiyonuna aracılık edebilirler ve bulgular hastalıklı periodontal dokuda T ve B lenfositlerin RANKL salınımının en büyük kaynaklarından biri olduğunu öne sürmektedirler (61, 63, 102). T lenfositler tarafından üretilen RANKL’ın büyük çoğunluğu çözünür formdadır, T hücre üzerindeki mRANKL salınımı limitlidir. Başka bir önemli bulgu da OPG tarafından baskılanabilen, antijen-spesifik lenfositleri alan hayvanların alveolar kemik krestindeki osteoklast sayısındaki artıştır (116, 122).

Gingival fibroblastlar heterojeniktir, LPS ve IL-1’e cevap olarak OPG üretirler. Osteoklast oluşumunu baskılamak için koruyucu rol üstlenmektedirler. Ancak aynı zamanda IL-6 ve IFN üretimi ile kronik enflamatuvar süreci de şiddetlendirebilirler. Periodontopatojenik bakterilerden *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) ve *Porphyromonas gingivalis* (Pg)’in osteoblastlar ve gingival fibroblastlarda RANKL’ı uyarmak için özgün mekanizmaları vardır. LPS ve IL-1 ile uyarıldığı zaman, osteoblastlar ve periodontal ligament fibroblastlar RANKL

salmaktadırlar. RANKL ve OPG salınımı aynı zamanda amelogenin fonksiyonu ve odontoklast formasyonunun düzenlenmesi ile de ilişkili olabilir (102, 103,104, 116). Periodontal sağlık ile karşılaştırıldığında, periodontitiste OPG baskılandığı zaman RANKL artmakta, RANKL/OPG oranındaki artış ile sonuçlanmaktadır. Bu oran ayrıca sigara kullanıcıları ve diyabette de artmaktadır (126). Osteoklast oluşumunun T hücre aracılı düzenlenmesinin moleküler mekanizmaları RANKL ve IFN- γ arasındaki çapraz-sinyalleşme ile meydana gelmektedir. T hücreler tarafından üretilen IFN- γ , transkripsiyon faktör NF-kb ve c-Jun N-terminal kinaz'ın RANKL ile indüklenen aktivasyonunun güçlü inhibisyonu ile sonuçlanarak RANK'a adapte protein, TNF reseptör ilişkili faktör 6 (TNF receptor activating peptide-6, TRAP6)'nın hızlı parçalanmasını uyarmaktadır (110).

2.4.1. Spesifik immün hücrelerin rolü

CD4+ ve CD8+ T hücreleri bellek ve aktive edilmiş T hücreleri olarak periodontal lezyonlarda bulunurlar ve farklı T hücre alt gruplarının RANKL-ilişkili periodontal kemik yıkımının baskılanması veya şiddetlenmesine katıldığı görülmektedir. Th1 ve Th2 tip T lenfositler ve onlarla ilişkili sitokinler Th1 profile doğru polarizasyon ile bulunabilmektedir (64, 110, 123, 127). Th1 tip hücreler kemik kaybını uyarmaktadır; regülatör T hücreler Th1 aracılı kemik kaybını baskımlarken, RANKL'ın Th1 tip hücreler üzerinden predominant olarak salındığı görülmektedir. Proenflamatuvar sitokinler IL-1 ve TNF- α 'nın üretimi Th1-tip T hücreler tarafından arttırılmaktadır. Bunlar osteoklast prekürsörlerinin uyarılması ve daha sonra osteoblastlar tarafından RANKL üretimi yoluyla osteoklastların aktivasyonu ile indirekt olarak kemik rezorpsiyonunu uyarabilmektedir (123, 127). Aktive olmuş T hücreler aynı zamanda OPG üretimi ve salınımı ile, direkt olarak osteoklast farklılaşmasını uyarabilmektedir. Periodontal kemik yıkımına katılan T hücrelerinin indirekt ve direkt modları enflame dokulardaki Th1-tip T hücre alımının miktarına bağlıdır (127). Bu değişimin kontrolü T hücrelerin Th1 ve Th2 alt grupları arasındaki denge ile yapılmaktadır, kronik periodontitis Th2 hücreler ile aracılıdır. Son zamanlarda periodontal dokularda T regülatör (Treg) ve Th17 hücreleri de tanımlanmıştır, hastalığın immünoregülasyonunda bu mediyatörlerinde rol aldığı

düşünülmektedir (125). Th17 ve IL-17'nin aynı zamanda periodontal kemik yıkımında yıkıcı rol aldığı gibi koruyucu role de sahip olduğu gösterilmektedir (128,129). Farklı çalışma modelleri enflamasyonda kemik yıkımı üzerindeki etkileri bakımından IL-17'nin zıt fonksiyonel rollerini rapor etmektedir. Al Shwaimi E ve ark. (128)'ları, IL-17'nin myeloid hücre aracılı enflamasyonun düzenlenmesine bağlı periapikal lezyonların gelişiminde koruyucu olduğu sonucuna varmıştır. Ancak periapikal lezyonda IL-17 sinyal-aracılı korumanın altında yatan mekanizmanın hala açıklanamadığı belirtilmiştir (128).

2.4.2. Bakteriyel etki

Periodontitis, diğer polimikrobiyal hastalıklara benzer olarak, periodontal sağlıktan periodontal hastalığa geçiş sırasında bulunan (Gram-pozitiften Gram negatif türlere) mikroorganizmalardaki değişim nedeniyle mikrobiyal-değişim hastalığı olarak karakterize edilmiştir (130).

Socransky ve ark. (131)'ları tarafından yapılan çalışmada, whole-genome DNA problemleri kullanılarak, periodontal sağlık ya da periodontal hastalık ile ilişkili çeşitli bakteriyel kompleksler tespit edilmiştir. Üç bakteri türü dizayn edilmiştir, gruplardan biri 'kırmızı-kompleks' periodontopatojenlerdir -*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* ve *Treponema denticola*- bu patojenler hastalık alanlarında birlikte bulunup hastalık ile güçlü ilişki göstermektedirler (131). *P. gingivalis* proenflamatuvar bakteri olarak direkt görev yapmaktan ziyade konak immün sistemin bileşenlerinden (örn: TLRs ve kompleman) kaçmak ve ya kurtulmak için çok yönlü stratejiler geliştirmiştir (132).

Periodontal hastalığın patolojik süreci primer olarak mikroorganizmalar tarafından başlatılan yıkımı ilerleten konak cevabı nedeniyledir. Zararlı patojenik ürünler ve hyalüronidaz, kollajenaz ve proteazlar gibi enzimler büyümeleri için besin üretmek amacıyla ekstraselüler matriks komponentlerini parçalamaktadırlar (112, 115, 116). *P. gingivalis* tarafından üretilen Arginin -ve Lizin- gingipain sistein proteinazları konak doku invazyonuna neden olan anahtar virülans faktörleridir. Öncelikle enflamatuvar süreç başlamaktadır, çeşitli moleküller (örn: proteazlar, MMPs, sitokinler, prostoglandinler ve konak enzimleri) lökositler ve fibroblastlardan

salınmaktadır. Aktive doku yıkıcı MMPs ve onların endojenöz inhibitörlerinin (endogenous tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMPs) seviyeleri arasındaki dengesizlik ispatlanmıştır. Böylece, bağ dokusu ataşmanı ve alveolar kemik yıkılmaktadır ve bağlantı epiteli ve enflamatuvar infiltratlar apikale göç etmektedir (1, 111, 118, 133). İlave olarak, osteoklastlar aktive olmaktadır ve direkt mekanizmalar ve RANKL, RANK ve OPG modülasyonu aracılığı ile indirekt olarak kemik yıkımı başlamaktadır. Periodontopatojenlerin varlığında, CD4+ T hücreler RANKL salınımında artış göstermektedir (101, 102, 121, 123). Yıkıcı patern devam ederken, sonrasında mikrobiyal yoğunluktaki artış periodontal lezyonu ilerletmekte ve yaymaktadır. Flora gittikçe daha fazla anaerobik hale gelmekte ve konak cevabı yıkıcı ve kronik bir hal almaktadır. Sonunda kemik kaybı ve yıkıcı lezyon diş kaybına neden olabilecek ilerleme göstermektedir (1, 112).

Bakteriyel virülans faktörleri kemik rezorpsiyonunu artırıcı özelliğe sahiptir. Gram negatif hücre duvarlarındaki endotoksinler makrofajlar ile etkileşime girerek rezorpsiyonu uyarmak için CD4+ T hücreleri aktive etmektedir. *P. gingivalis*, enfekte hayvanlarda kemik kaybını önleyen antikorlara karşı, tirozin kinaz mekanizmaları aracılığı ile güçlü osteoklast uyarıcısı olan, fimbrial protein üretmektedir (80). *A.actinomycescomitans*, pikomolar konsantrasyonda kemik kaybını uyarma yeteneği ile ilişkili 62kDa ısı şok proteinleri üretmektedir; ayrıca peptidfibroblastlar ve monositlerde güçlü IL-6 indükleyicisi olarak görev yapmaktadır (1, 109, 110). *Treponema denticola* ve *T.forsythia*'nın diğer virülans faktörleri kompleman rezistansı ile ilişkili komplemanın negatif regülatörünün spiroketal yüzey proteinlerine bağlanmasını içermektedir (134, 135). *T.denticola*'nın periodontal cepte millimolar konsantrasyonda sülfid üretmek için sırayla bakteriyi etkinleştiren piruvat, amonyak ve sülfid üretmek için L-sisteinin α , β eliminasyonunu katalize eden enzim olan sistalisini (cystalysin) ürettiği gösterilmiştir. Sülfid, gingival ve periodontal dokularda hasar ve hemolitik ve hemoksidatif aktivitelerden sorumludur. Hatta sülfid *T. denticola*'ya seçici fayda sağlayan bir ekolojik niş oluşturmaktadır (136).

T. forsythia immün cevabın etkilenmesinde immünomodülatör rol oynayan yüzey- (S-) tabakası olarak bilinen özgün glikozillenmiş yüzey örtüsü

oluşturmaktadır. Bu S-tabakası *in vitro* monosit ve makrofajların gecikmiş sitokin cevabında önemli role sahiptir (137). Settem RP ve ark. (138)'ları periodontitisin fare modelinde *Tannerella* yüzey proteinlerine bağlanmış O-glikan çekirdeği üzerinde trisakkarid dalı içeren terminal pseudaminik asit ve N-asetilmannosaminuronik asitin, gingival doku içine nötrofil infiltrasyonunun azalmasında ve Th17 farklılaşmasının önlenmesinde rol oynadığını göstermektedir.

2.4.3. Doğal immün cevap, TLRs ve PAMPs

Periodontopatik bakteriye karşı konak cevabı doğal ve kazanılmış immüniteden oluşmaktadır. Doğal cevap konaktan değil ama patojenlerin üzerinden salınan patojen ile ilişkili moleküler patern (Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMPs) denilen korunmuş evrimsel moleküler motiflerin tanınması yoluyla büyük sayıda patojenler arasında ayırım meydana getirmektedir. Son zamanlarda keşfedilen TLRs mikropların tanınmasında ve enflamatuvar ve konak savunma cevaplarının başlatılmasındaki anahtar rolleri ile patern-tanım reseptörleridir (139). Bu sinyalleşme reseptörleri, PAMPs için spesifitenin tanınması ile konak tarafından patojenin tanınmasında oldukça önemlidir (1, 140). TLRs; myelomonositik hücreler, endotelial hücreler, epitelyal hücreler ve gingival fibroblastları içeren diğer hücreler tarafından salınmaktadır (1). TLRs tarafından tanınan PAMPs örnekleri peptidoglikan bakteriyel LPSs ve Pg LPS (TLR-2), çift sarmallı ribonükleik asit, LPS ve ısı şok proteinleri (TLR-4) ve flagellin (TLR-5) içermektedir (139, 140).

TLR-PAMP etkileşimi daha sonradan IL-1R ilişkili kinaza bağlanacak olan spesifik adaptör moleküllerin alımı ile sonuçlanmaktadır. Sinyal, TNF reseptör ilişkili faktör-6 (TRAF-6) ve mitojen ile aktive edilmiş protein kinaz (mitogen activated protein kinases, MAPKs) içeren tüm TLRs için ortak sinyal moleküller zinciri boyunca iletilmektedir (103, 139). Sonrasında RANK aktivasyonu ve aktive olmuş protein-1 doğal savunmanın uyarılmasına katılan genlerin transkripyonuna neden olmaktadır. Hem dokuya lenfositlerin migrasyonu ve güçlü bağlanmasına neden olan hem de anlamlı kemik rezorpsiyonuna katılan proenflamatuvar sitokinlerin salınımını arttıran interselüler adezyon molekülü-1 salınımı (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) ve lenfosit fonksiyonu ile ilişkili antijen-1 (lymphocyte function associated antigen-1, LFA-1) örnek olarak verilebilir (103,

127). IL-8 salınımı nötrofilleri çekmektedir ve endotelial hücrelerin, makrofajların, dendritik hücrelerin aktivasyonu ve nötrofiller doku hasarının direkt mekanizması ile MMPs uyarmaktadır. Makrofajlarda patojenik peptidler ile uyarıldığı zaman direkt olarak aktive olmaktadır ve MMP-1 ve NO gibi biyolojik mediyatörleri ve çeşitli sitokinleri üretmektedirler (1, 116, 141).

Dişeti fibroblastları ve periodontal ligament hücrelerin TLR-PAMP tanıma ve RANKL-aracılı cevapların katılımı ile LPS stimülasyonuna yanıt için donatıldığı geçmiş yıllarda toplanan veriler tarafından kanıtlanmıştır. Hücreler *P.gingivalis*, *P.intermedia* ve *A.a* gibi patojenlerden oral bakteriyel LPS fraksiyonları ile uyarıldığı zaman IL-1, IL-6 ve IL-8 gibi çeşitli enflamatuvar sitokinler üretmektedirler (1, 116, 139, 141, 142).

PAMPs'lara yüksek duyarlılıktaki osteoblastlar da hem kemik rezorpsiyonuna hem de koruyucu faktör OPG'nin inhibisyonuna katılan sitokinlerin ve mediyatörlerin üretimi için de uyarılabilmektedirler. *P.intermedia* LPS kemik mineralizasyonunu ve osteoblastların farklılaşmasını engellemektedir. Sementoblastlar LPS ile uyarıldığı zaman RANKL seviyelerinde azalma ve hem OPG hem OPN salınımında artış gözlenmektedir, kemik ve kök rezorpsiyonuna karşı koruyucu mekanizma geliştiği düşünülmektedir (1, 103,117).

İlave olarak, farklı periodontopatojenlerden LPS, CPg DNA ve *Aa* kapsüler polisakkarid kemik iliği hücrelerinden osteoklast farklılaşmasını uyarmaktadır. PAMPs tarafından uyarılan monositler osteoklastlara artan farklılaşma göstermektedir ve uyarılan RANKL salınımı merkezi rol oynamaktadır (103,139). GM-CSF ve M-CSF gibi ko-stimülatör faktörler IFN- γ üretmek için hücre aracılı Th1 T hücre cevabının gelişimine neden olan T hücreleri aktive eden IL-12'nin salınımında da önemlidir. Buna karşılık, ko-stimülatör faktörler olmadan, Th2 yanıtı hakimdir (104, 123, 124). Son zamanlarda, insan gingival fibroblastlardaki proenflamatuvar sitokinler IL-6 ve IL-8'in aktivasyonu ve TLR2 ve TLR4 sinyal transdüksiyonun salınımı üzerine *P.gingivalis* LPS1435/1449'in etkileri araştırılmıştır ve bu lipid *Aa* yapılarının farklı olarak TLR-4 aracılı NF- κ B sinyal yolunu aktive ettiği ve anlamlı olarak IL-6 ve IL-8 salınımını düzenlediği öne

sürülmüştür (143). TLR2 aktivasyon kabiliyeti belirlenmiş intakt *P. gingivalis* hücrelerinin yüzeyindeki ligandların tanınmasını amaçlayan çalışmada bunun LPS kontaminantları nedeniyle olduğu bulunmuştur (144). *P.gingivalis* tarafından antogonistik ya da immünolojik olarak inert lipid A salınımının TLR4 sinyalizasyonundan kaçınmak için bir mekanizma olduğu çok sayıda raporda belirtilmiştir (145).

Özet olarak, LPS ile indüklenen hastalıklar gingival dokularda enflamatuvar hücrelerin alınması, prostanooidlerin ve sitokinlerin oluşumu, litik enzimlerin hazırlanması, osteoklastların aktivasyonunu içeren lokal konak cevabının başlamasına neden olmaktadır. Özellikle LPS RANKL, IL-1, PGE₂ ve TNF- α 'nın osteoblastik salınımını arttırmaktadır. Bunların hepsinin osteoklastik aktiviteyi, varlığını sürdürebilmeyi ve farklılaşmayı indüklediği bilinmektedir (103, 104, 116, 124, 141, 142). Spesifik CD4+T hücreleri, güçlü monositleri, makrofajları ve fibroblastları içeren çeşitli immün ilişkili hücre popülasyonları periodontal dokuda patojenik süreçten sorumludur. Bunlar DOS'ta tespit edilebilen ve görüntülenebilen lezyon içinde bulunan sitokinleri (TNF- α , IL-1 β gibi) üretmektedirler. Bu sitokinler yıkıcı kaskad için MMP, prostaglandin ve osteoklastların üretimini tetiklemektedirler. En son olarak da, dişi destekleyen yumuşak dokuların ve alveolar kemiğin geri dönüşümsüz hasarı meydana gelmektedir (100, 118).

Kemik, osteoklastlar ve osteoblastlar aracılığı ile sürekli olarak rezorpsiyon ve formasyonun devam ettiği dinamik bir dokudur ve bu süreç kemik remodelingi olarak bilinmektedir. Kemik aynı zamanda normal Ca⁺² plazma seviyesinin korunması için Ca⁺² kaynağı olarak görev yapan fizyolojik vital bir dokudur (5). Bu nedenle Ca⁺² kemik sağlığında en çok çalışılan besin maddelerindendir ve osteoporozun önlenmesinde ve tedavisinde oldukça önemlidir (146). Besinlerden ve/veya ek gıdalardan Ca⁺² ve vitamin D'nin genç yaşlarda iken yeterli miktarda tüketimi ileriki yaşlarda kemik kaybı hızını azaltmak için gereklidir (5). Günlük olarak alınan diyet komponentleri normal kemik metabolizması için oldukça gereklidir (6, 7).

Çok çeşitli endojenöz ve ekstrasjenöz faktörler kemik dokunun formasyonu, absorpsiyonu ve remodelingini kontrol etmekte ve olumlu veya olumsuz olarak

etkilemektedir. Çeşitli laboratuvar ve klinik çalışmalar ile antioksidanlar, tıbbi bitki özütleri, aminoasitler ve vitaminler kullanılarak yumuşak doku ve sert doku kemik metabolizması üzerine yeni yaklaşımlar geliştirilmektedir (8).

Yapılan literatür taramasında enerji içeceklerinin içinde bulundurduğu maddeler ile metabolizma hızını arttırdığı, merkezi sinir sistemini uyardığı tespit edilmiştir (12, 10, 13, 147, 148). Ayrıca enerji içeceğinin yumuşak doku yararıylaşmesi üzerine etkilerini değerlendiren deneysel bir çalışma da bulunmaktadır (14). Ancak ağız içinde alveolar kemik doku üzerine etkilerini araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır.

2.5. Enerji İçecekleri

Enerji içecekleri hücre metabolizmasını hızlandıran çeşitli materyaller içermektedir ve bir çok ülkede yaygın bir şekilde tüketilmektedir. Enerji içeceklerinin öncülü olabilecek içeceklerin ilk defa 1949 yılında Amerika Chicago'da seri üretime geçildiği 1960'da Japonya'da, 1980'de İngiltere'de benzer içeceklerin üretildiği bilinmektedir. Dünyada şimdiki manada yaygın kullanımı 1980'li yıllara rastlamakla birlikte Türkiye'de enerji içeceğinin satışa sürüm yılı ise 1990'lı yıllara denk gelmektedir (11).

Enerji içecekleri son birkaç yıldır dünya çapında hedef kitle olarak özellikle gençler ve genç yetişkinler arasında internet, reklam ve televizyon kampanyaları sayesinde oldukça popüler olarak tüketilmektedir (9, 10). Metabolizmayı hızlandırdığı, vücut direncini arttırdığı ve enerji verdiğine inanıldığı için her yaşta kullanılmakla birlikte, özellikle 11-35 yaşları arasındaki öğrenci, sporcu ve yoğun çalışan bireyler tarafından daha yaygın olarak tüketilmektedir (11). Bu içecekler genellikle çeşitli yararlar sağlayan fonksiyonel içecekler olarak pazarlanmaktadır; özellikle konsantrasyon ve zihinsel performansı geliştirerek zaman içinde performansı arttırdığı, uyanıklığı arttırdığı ve yorgunluğu azalttığı düşünülmektedir (12). Dünyada çok sayıda farklı marka enerji içeceği bulunmaktadır ve her yıl yaklaşık olarak 4 milyar kutu sadece Redbull® marka enerji içeceği tüketilmektedir (13).

Enerji içecekleri genellikle çok çeşitli maddeleri içermektedir, sıklıkla bulunanlar: kafein, taurin, sükroz/glukoz, vitaminler ve guarana, ginseng ve ginkgo biloba gibi bitkisel suplemanlardır. Farklı marka enerji içeceklerinin içeriği benzerolmasına rağmen, bazı değişiklikler bulunabilmektedir (örneğin, içerdiği B vitamini türü). En sık bulunan maddeler aşağıda açıklanmaktadır (9, 12):

2.5.1. Kafein

Kafein (1,3,7-trimethylxanthine) bitkisel pürin alkaloididir. Hücre içi cAMP mediyatörlerinin konsantrasyonundaki artış ile protein kinaz A'yı (kinase A protein, PKA) aktive ederek ve adenil siklaz enziminin fonksiyonunu değiştirerek Adenozin reseptör antagonisti olarak görev yapmaktadır (A_1 , A_{2a} , A_{2b} , A_3) (149). Santral ve periferik sinir sistemini etkileyebilen bir uyarandır (150). Yapılan çalışmalar kafein ve kafein metabolitleri olan teobromin ve ksantin antioksidan etkilerinin olduğunu göstermiştir (151). Çalışmalar kafeinin artan periodontal hastalık, osteoporoz ve fraktür riski ile anlamlı ilişkili olduğunu öne sürmektedir (152, 153, 154). Kafeinin kemik metabolizması üzerindeki etkisi henüz tam olarak açıklanamamıştır. Kemik üzerindeki etkisinin idrarda Ca^{+2} atılımını arttırma yeteneğinden kaynaklandığı belirtilmektedir (153). Kemik üzerine kafeinin etkileri artan ürener Ca^{+2} atılımı ve azalan Ca^{+2} absorpsiyonu nedeniyle negatif Ca^{+2} dengesi ile bağlantılı olabilir (153, 155). Bir başka olası mekanizma da osteoblastik hücrelerin fonksiyonu ve canlılığı üzerine kafeinin etkisi ile ilişkili olabilir (156, 157, 158). Bazı hayvan çalışmalarında kemik gelişimi üzerine kafeinin etkileri tam olarak gösterilememiştir, bazılarında ise normal büyüme ve kemik gelişimi üzerine kafeinin olumsuz etkileri ve kemik Ca^{+2} içeriğinde azalma gösterilmiştir (153, 159).

2.5.2. Taurin

Vücuttaki en önemli antioksidan maddelerden biri de yarı esansiyel bir amino asit olan taurindir (2-aminoethanesulfonic acid). Taurin çeşitli memelilerde ve memeli olmayan dokularda bulunmaktadır. Çeşitli organlar ve doku komponentlerinde önemli fizyolojik ve patolojik rollere sahiptir. Taurinin eksikliği göz, kalp, böbrek, beyin gibi çok çeşitli organlarda gelişme aşamalarında ve sonrasında anomalilerin meydana gelmesine neden olmaktadır. Taurinin;

osmoregülasyon, membran stabilizasyonu, Ca^{+2} seviyesinin düzenlenmesi, nörotransmitter ve hormon salımının düzenlenmesi, antimikrobiyal etki, glukoz ve glikogenin stimülasyonu, antioksidan (özellikle serbest radikal hasarından böbrekleri korumaktadır), antiapoptotik, antilipid etki (ateroskleroza indükleyen lipidi ve kolesterol sentezini inhibe etmektedir), antienflamatuvar hücre çoğalması (kemik iyileşmesinde osteoblast çoğalması) gibi birçok fonksiyonu bulunmaktadır (160, 161, 162). Taurinin antioksidan etkisi hücre proliferasyonu, enflamasyon ve kollajen oluşumunu etkilemektedir (163). Taurinin antioksidan ve antiapoptik etkileri yara iyileşmesini geliştirmekte ve aynı zamanda insizyonel deri yaraları üzerine oksidasyon hasarını engellemektedir (162). Çalışmalarda oral epitel yüzeyine gingivektomi sonrası topikal uygulama ile hızlı reepitelizasyon elde edildiği gösterilmiştir (164, 165). Kemik matriks formasyonu ve kollajen sentezinde taurinin güçlü uyarıcı rolü osteoblast benzeri UMR-106 hücrelerinde gösterilmiştir. Bununla beraber, periodontal hastalıkta enflamatuvar kemik rezorpsiyonunun önlenmesi için taurinli ajan kullanımı ile osteoklast formasyonu ve kemik rezorpsiyonun önlendiği de ifade edilmiştir (166). Böylece taurin çift etkili bir ajandır; kemik formasyonunu uyarmakta ve kemik kaybını önlemektedir. Deneysel kemik rezorpsiyonunu ve osteoklast formasyon ve survivalını engellediği bulunmuştur (167). Bu aminoasidin alkalen fosfataz (alkaline phosphatase, ALP) aktivitesi ve kollajen sentezi üzerine uyarıcı etkileri bulunmaktadır (168). Aynı zamanda düşük Ca^{+2} diyeti ile indüklenen osteopenili sıçanlarda anti-osteopenik etkilerinin olduğu, böylece mineralizasyonu uyardığı ve kemik anabolik aktivitesine neden olduğu da gösterilmiştir (169). Taurin, B12 sentezinde rol oynamaktadır ve kemik yapımındaki etkisi de karaciğeri detoksifiye etmesi ve Potasyum (K^{+1}), Magnezyum (Mg^{+2}), Sodyum (Na^{+1}) ve Ca^{+2} fonksiyonunda görev alması ile ilişkilidir (170, 171).

2.5.3. Arjinin

Arjinin diyetel yarı-esansiyel bir aminoasit olup büyüme, şiddetli travma, stres ve kritik hastalık durumlarında alınması gereklidir. Arjinin; hücre bölünmesi, immün cevabın modülasyonu, hücrel toksin olan amonyağın detoksifikasyonu, yara iyileşmesi, hormon sekresyonu, insülin direncinin azaltılması, vasküler tonus ve endotelial fonksiyon gibi birçok biyolojik olayda etkilidir (172). NO sentezi için

prekürsördür (173). Ayrıca NO, kemik hücre aktivitesi üzerinde anabolik etkiler oluşturarak insanlarda kemik turnover'nın önemli düzenleyicisidir. Kollajen sentezini desteklemektedir ve kemik büyümesine katılan önemli bir aminoasittir. Kemik kütlelerini oluşturan osteoblastların büyümesini desteklemektedir. Özellikle kemikte yara iyileşmesi zamanını azaltmakta ve süreci hızlandırmaktadır. Klinik olarak hipertansif deneklerde kan basıncının azalmasına yardımcı olmaktadır. Arjinin NO salınımı ile periferik ve koroner damarların oksijen desteğini ve sirkülasyonunu geliştirmektedir. Arjinin alındığında, kandaki NO seviyesi artmaktadır. NO kan damarlarının duvarlarını serbestleştirmekte ve böylece tüm vücutta sirkülasyon gelişmektedir. Arjinin büyüme hormonu salgılanmasını ve IGF-1 cevabını da uyarmaktadır (174, 175). Büyüme hormonu ve IGF-1 osteoblastik kemik formasyonu ve kemik turnover için önemli mediyatörlerdir, NO da osteoklastik kemik rezorpsiyonun potansiyel inhibitörüdür. Fizyolojik veya patolojik stres ve travma durumunda arjinin gereksinimi artar ve kollajen depozisyonu, anjiyogenez ve yara kontraksiyonunu hızlandırmak için dışarıdan alımı artırılmalıdır. Arjininin beslenmeye yüksek miktarlarda eklenmesi ile yara iyileşmesi sürecinde anlamlı yararlı etkilerinin görüldüğü ve biyolojik stres durumunda katabolik metabolik değişimleri azaltılabileceği yapılan çalışmalarda öne sürülmüştür (176). Taurin ve arjininin büyüyen dişi sıçanlarda kemik formasyonu ve kemik rezorpsiyonu belirleyicileri ve kemik mineral yoğunluğu üzerine etkilerini araştıran bir çalışmada, femur kemik mineral yoğunluğu üzerine taurin ve arjininin beslenmede birlikte kullanımının yararlı olabileceği öne sürülmüştür (177).

2.5.4. Sükroz/Glukoz veya Aspartam/Asesülfam Potasyum

Glukoz, hücresel ATP'nin majör kaynağıdır. Ayrıca hücresel ATP, anjiyogenezis ve yeni doku depozisyonu için gerekli olan enerjinin kaynağıdır (178). Şekersiz formunda ise tat verici olarak aspartam ve asesülfam potasyum bulunmaktadır. Aspartam, kimyasal formülü aspartil-fenilalanin-1-metil ester olan bir tatlandırıcıdır. Asesülfam K, sükraloz ve aspartam gibi diğer düşük kalorili ve kalorisiz tatlandırıcılarla birleştirildiği zaman sinerjistik bir tatlandırma etkisi sağlamaktadır.

Yüksek sükröz diyeti, insanlarda ve hayvanlarda mineral metabolizmasını değiştirmektedir. Yüksek sükröz ve yağ içerikli diyetler hiperinsülinemiýi uyurabilmekte, Ca^{+2} ve Mg^{+2} metabolizmasını etkileyebilmekte ve kemiğin mineralizasyon ve mekanik özelliklerini değiştirebilmektedir.

2.5.5. B vitaminleri

B vitaminleri, suda çözünen vitaminlerdir ve özellikle mitokondriyal fonksiyon ve enerji üretimi gibi hücre fonksiyonları için koenzim olarak gereklidirler.

2.5.5.1. Tiamin (Vitamin B1)

Karbonhidrat metabolizmasındaki bazı anahtar enzimlerin ko-enzim öncüsü olarak çalışır ve kollajen yapımı için gereklidir (178, 179).

2.5.5.2. Riboflavin (Vitamin B2)

Solunum zincirinin flavo enzimleri için gereklidir. Böylece yağlar, karbonhidratlar ve proteinleri içeren enerji metabolizmasını destekler ve kollajen yapımı için gereklidir (178, 180).

2.5.5.3. Niasin (Vitamin B3)

Nikotinamidadenindinükleotid (NADH)'in indirilmiş formu bu vitaminden sentezlenir. Bu ko-enzim hücrelerde enerji üretiminde majör bir rol oynar ve oksidatif fosforilasyon için proton desteği sağlamaktadır (181). Ayrıca nörotransmitter ürünlerin (L-dopa, dopamin, serotonin ve nörepinefrin) salınımını uyarmaktadır.

2.5.5.4. Pantotenik asit (Vitamin B5)

Koenzim A, α -ketoglutarat, piruvat dehidrogenaz oluşumu ve yağ asidi oksidasyonu ve kollajen yapımı için gereklidir (178).

2.5.5.5. Piridoksin hidroklorid (Vitamin B6)

Amino asit ve homosistein metabolizması, glukoz ve lipid metabolizması, nörotransmitter ürünler ve Deoksiribonükleik Asit (DNA), Ribonükleik Asit (RNA) sentezine katılan bir koenzimdir (182). Özellikle protein ve kırmızı kan hücresi metabolizmasına katılır ve immün sistem fonksiyonu için önemlidir.

2.5.5.6. Biotin (Vitamin B7)

Dekarboksilaz koenzimi olup, glikoneogenezis ve yağ asidi oksidasyonu için gereklidir (182).

2.5.5.7. İnositol (Vitamin B8)

İnsan vücudunda sentezlendiği için vitamin olarak sınıflandırılmaz. Dokuz stereoizomeri bulunur ve en yaygın formu myoinositoldür. Hücre membranının bir parçasıdır. Karaciğer yağ sentezinde yardımcı rol oynar, kas ve sinir fonksiyonlarını desteklemektedir (183).

2.5.5.8. Siyanokobalamin (Vitamin B12)

Esansiyel suda çözünabilen bir vitamindir. Vertebralarda çok sayıda hücresel olayı düzenlemekte ve sinir hücre fonksiyonunu sürdürmeye yardım etmektedirler. DNA ürünleri için gereklidir ve kırmızı kan hücresi oluşumunda önemli rolü vardır (182). Taurin sentezi ile sütten kesim sonrası büyümeleri ve kemik oluşumlarını olumlu yönde düzenlemektedir. Kemik kütlesini arttırmak için potansiyel tedavi olarak gösterilmektedir (184). Vitamin B12 konsantrasyonu ile kemik iliği stromal osteoprogenitor hücreleri ve UMR106 osteoblastik hücrelerine timidin inkorporasyonu gösterilmiş olup, bu bulgular vitamin B12'nin osteoblastik fonksiyona direkt etkisi olduğunu göstermektedir (185, 186). Ayrıca *invitro* bir çalışmada düşük vitamin B12 seviyesinin osteoklastik aktiviteyi arttırdığı da gösterilmiştir (187). B12 eksikliği büyüme retardasyonu, azalan serum osteokalsin seviyeleri, düşük kemik mineral yoğunluğu ve artan kemik fraktür riski ile ilişkilidir (188, 189, 190, 191, 192).

2.5.6. Guarana

Güney Amerika kaynaklı '*Paullinia cupana*' bitkisinin tohumundan elde edilen uyarıcı özelliği olan bir maddedir ve yüksek oranda kafein, teobromin, teofilin ve tanin içerir (11). Kilo kaybını kolaylaştırmak, atletik performans kazanmak ve mental ve fiziksel yorgunluğu azaltmak için uyarıcı olarak kullanılmaktadır. Guarananın bu özellikleri yanında diğer faydalı özellikleri dolayısıyla tıp alanında da kullanılmıştır (193). Düşük kan basıncının ve kronik yorgunluk sendromunun tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca antibakteriyel ve antioksidan olduğunu gösteren çalışma da mevcuttur. Çalışmada antibakteriyel etkisi sindirim sistemindeki bazı patojenlere karşı gösterilen güçlü aktivite nedeniyle diyare ve dizanteriye karşı ve antioksidan etki de ateroskleroza karşı gösterilmiştir (194).

2.5.7. Ginseng

Farklı 4 alt tipi vardır (*Chinese and Korean ginseng-Panax ginseng*, *American ginseng-P.quinquefolium*, *Sanqi ginseng-P notoginseng*). '*Panaks ginseng*' bitkisinin tohumlarından elde edilen tipi enerjiyi artırma, hafızayı geliştirme (Alzheimer tedavisinde), strese karşı vücut direncini artırma ve afrodisyak etkileri nedeniyle kullanılmaktadır (11). Ayrıca hemostazı düzenleme (195), anjiyogenezi uyarak yara iyileşmesini hızlandırma (196, 197); TNF- α , IL-1 β seviyelerinde azalma sağlayarak antienflamatuvar ve antiromatizmal etki sağlama (196, 198), ayrıca tümör büyümesini inhibe edici (197), süperoksit radikallerini temizlenmesi, lipid peroksidasyonunu ve oksidatif hasarı azaltarak antioksidan özellik gibi etkilerinin de olduğu gösterilmiştir (198). *Panaks ginseng* de bol miktarda bulunan Ginsenoside Rg1, kemik iliği stromal hücrelerini ve endotelial progenitor hücre proliferasyonunu artırabilmektedir (199, 200). Aynı zamanda osteoblastların sayısını, kültüre osteoblastlarda ALP aktivitesini, overektomili sıçanlarda kemik kaybını önlerken kemik formasyonunu arttırdığı yapılan çalışmalarda gözlenmiştir (201, 202). Ginsenoside Rg1 hücre proliferasyonu, diferansiyasyonu ve kemik formasyonunu uyarmaktadır (203).

2.5.8. Ginkgo biloba

Ginkgo biloba ağacının yeşil yapraklarından elde edilen (204) ve gümüş Japon kayısısı olarak da bilinen bu bitki; baş ağrısı, duyma problemleri, kulak çınlaması, vertigo, erektil disfonksiyon, kan sirkülasyonunu daha iyi sağlayarak diz ağrıları ve Raynaud sendromu, mental aktivitenin artırılması (örn: Alzheimer hastalığında) gibi birçok alanda kullanılmaktadır (194). Ayrıca antioksidan, nörotransmitter aktivite, trombosit aktive edici faktör ve NO ürünleri üzerine inhibitör etki, kollajen üretimi ve ekstraselüler matriks sekresyonunu azalttığını, antifibrotik etkiye sahip olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (194, 204).

Bu bilgiler ışığında bu araştırmanın amacı, yaygın bir şekilde kullanılmakta olan enerji içeceğinin (RedBull®), deneysel periodontitis oluşturulmuş sıçanlarda alveolar kemik doku üzerindeki etkisini; mikro bilgisayarlı tomografi ile ve histometrik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal olarak incelemektir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Abant İzzet Baysal Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yürütülmüş olup, Abant İzzet Baysal Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan deney için 2015/39 protokol numarası ile onay alınmış ve Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2015.06.05.940 proje numarası ile desteklenmiştir.

3.1. Denekler ve Değerlendirme Periyodu

Çalışmada, Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan temin edilen ağırlıkları 200-300 gram arasında değişen 10-12 haftalık 32 adet erkek Albino Wistar sıçan kullanılmış ancak anestezi komplikasyonuna bağlı olarak 1 sıçan kaybedilerek 31 sıçan ile çalışma tamamlanmıştır. Tüm hayvanlar aynı şartlarda, standart nem ve ışıktaki, 12 saat gece 12 saat gündüz döngüsünde, $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ 'lik ortamda 8'li gruplar halinde plastik tabanlı tel kafeslerde barındırılmış, ad libitum besin ve su ile beslenmişlerdir (Fotoğraf 3.1).



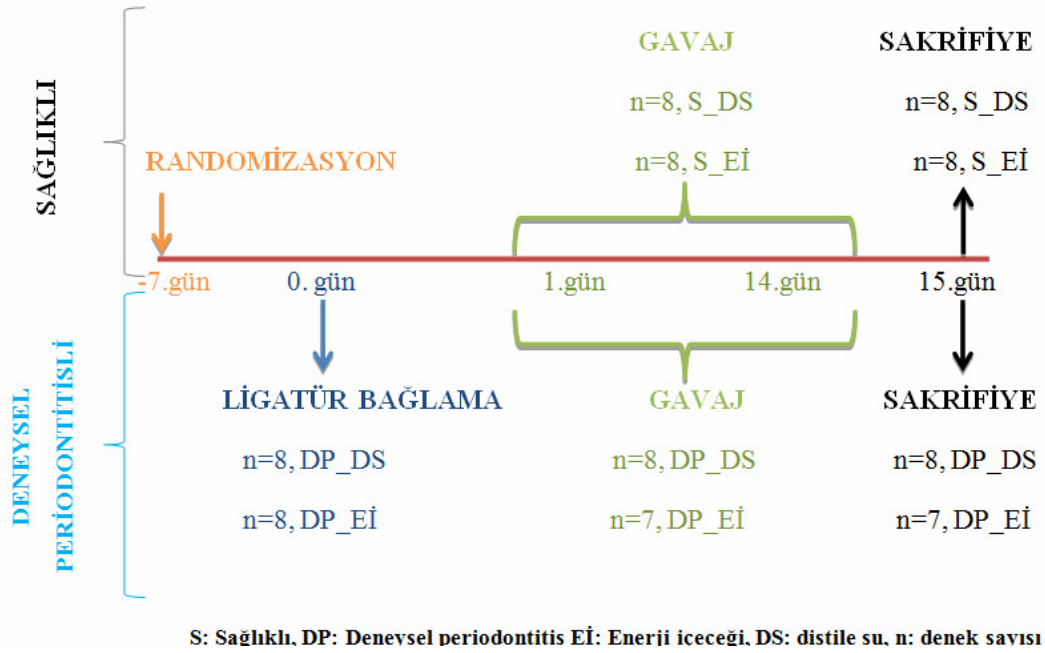
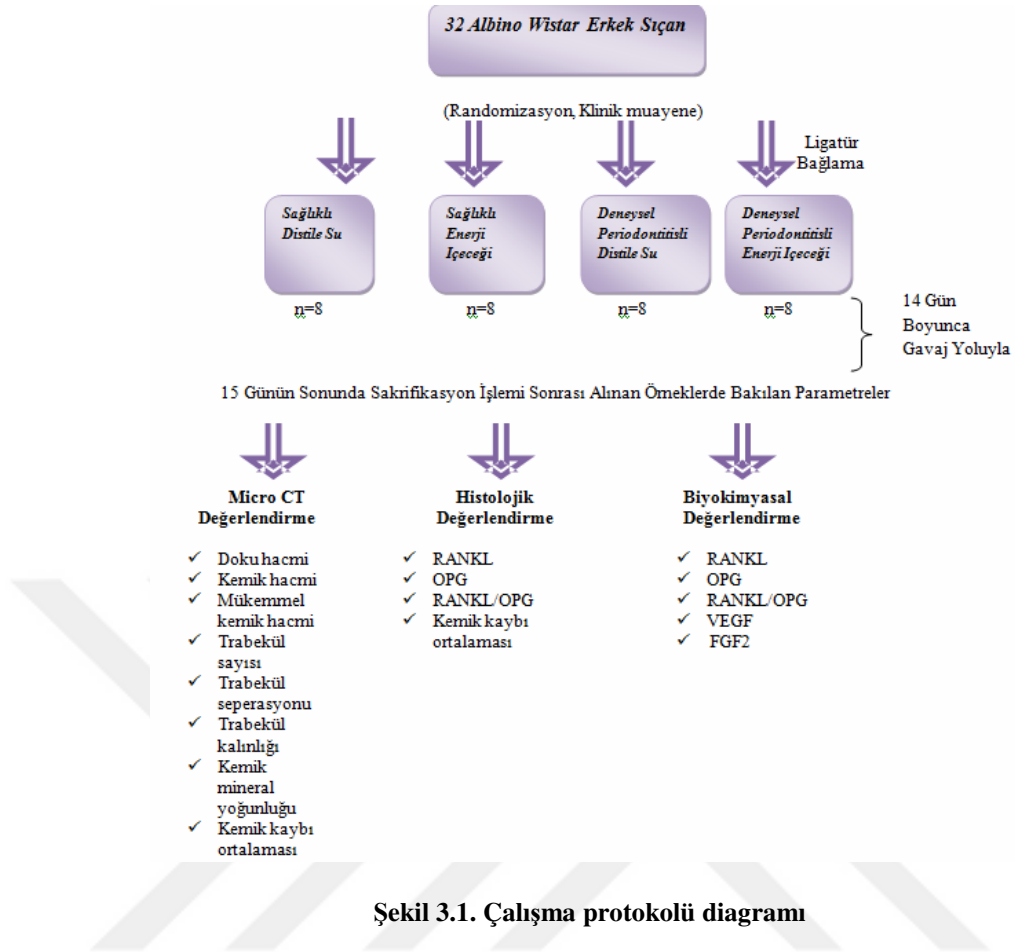
Fotoğraf 3.1. Sıçanların 8'li gruplar halinde barındırılması

Periodontitis modeli oluşturabilmek için tüm sıçanların ilgili dişlerinin servikalleri etrafına aynı gün subgingival olarak ligatrler bağlanmışve ertesı gün başlanan gavaj uygulamasını takiben 14 gün sonra uygun anestezi protokolü ile sıçanlar sakrifiye edilmiştir. Ayrıca sakrifiye edilirken alınan kardiyak kan örneklerinde de biyokimyasal parametrelerden VEGF, FGF₂, OPG ve RANKL'a bakılmıştır. Her bir sıçanın st çenesi diseke edildikten sonra, santral insizrler arasından orta hattı takip ederek sağ ve sol çeneler birbirinden ayrılmış ve randomize bir şekilde değerlendirilmiştir. Bir yarım çenede mikro bilgisayarlı tomografi ile değerlendirme, diğer yarım çenede histometrik ve immünohistokimyasal parametrelerden de OPG ve RANKL'a yönelik değerlendirme yapılmıştır.

3.2. Deneklerin Randomizasyonu ve Graplara ayrılması

Çalışmada denekler (n=32) randomize olarak 4 gruba ayrılmıştır:

1. Grup Sağlıklı_Distile Su (n=8): Ligatür uygulaması ile deneysel periodontitis oluşturulmayan ve oral yoldan (gavaj ile) distile su uygulanan gruptur (Grup S_DS).
2. Grup Sağlıklı_Enerji İeeği (n=8): Ligatür uygulaması ile deneysel periodontitis oluşturulmayan ve oral yoldan (gavaj ile) enerji ieeği uygulanan gruptur (Grup S_Eİ).
3. Grup Deneysel Periodontitis_Distile Su (n=8): Ligatür uygulaması ile deneysel periodontitis oluşturulan ve oral yoldan (gavaj ile) distile su uygulanan gruptur (DP_DS).
4. Grup Deneysel Periodontitis_Enerji İeeği (n=8): Ligatür uygulaması ile deneysel periodontitis oluşturulan ve oral yoldan (gavaj ile) enerji ieeği uygulanan gruptur (DP_Eİ) (şekil 3.1).



Şekil 3.2. Çalışma zaman çizelgesi

3.3. Deneysel Periodontitis Modeli

Deneysel periodontitis modeli oluşturmak için sıçanlara 40-50 mg/kg ketamine, 2-5 mg/kg xylazine intramuskuler olarak uygulanarak sıçanlar anestezi altına alınmıştır (Fotoğraf 3.2, 3.3).

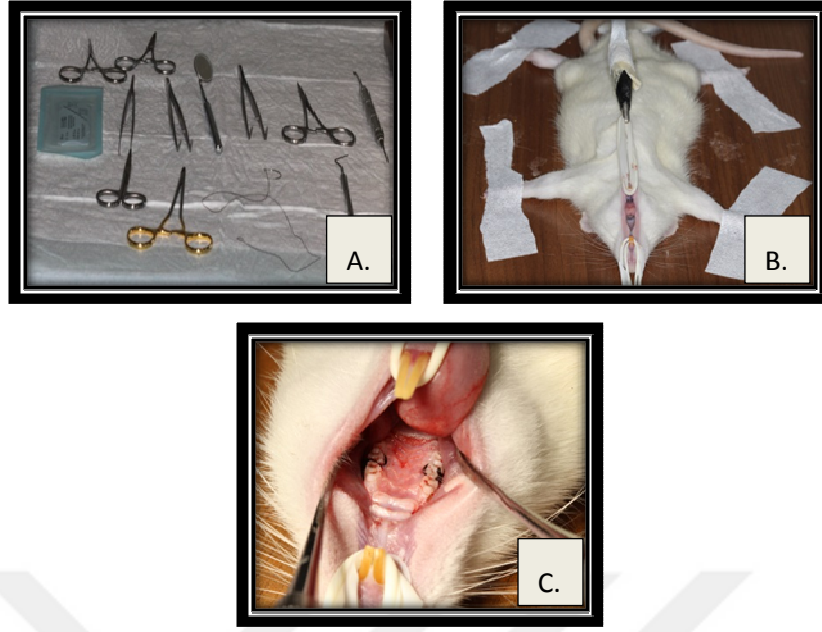


Fotoğraf 3.2. Model oluşumu için anestezi solüsyonların hazırlanması



Fotoğraf 3.3. İntramuskuler enjeksiyonun uygulanması

Anestezi derinliğini teyit etmek için, sıçanların cilt ve parmak kıstırmaya karşı refleksleri kontrol edilmiştir. Her sıçan için sağ ve sol üst 2. molar dişlerin servikalleri etrafına 3.0 ipek sütursubgingival olarak yerleştirilerek deneysel periodontitis modeli oluşturulmuştur (Fotoğraf 3.4) (205).



Fotoğraf 3.4. Deneysel periodontitis modelinin oluşturulması

- A. Kullanılan malzemeler**
- B. Sıçanın uygun pozisyonda sabitlenmesi**
- C. Ligatürlerin ilgili dişlere bağlanması**

Ligatürler 14 gün boyunca bölgede tutulmuş ve haftada 2 kez anestezi uygulanmadan kontrol edilmiştir (206).

3.4. Deneysel Protokol

Test grubuna açken (öğle saatlerinde), deneyel periodontitisin oluşturulduğu günün ertesi günü başlamak kaydı ile sakrifiye edilene kadar her gün, 14 gün boyunca, günde bir defa olmak üzere oral gavaj yoluyla enerji içeceği (Eİ) verilmiştir (Fotoğraf 3.5).



Fotoğraf 3.5. Kullanılan enerji içeceği (RedBull®, Türkiye)

Sıçanların enerji ieeğini içerken ağız ile teması göz önüne alındığında olası lokal etkileri de düşünülerek enjektör çekilirken ağız içerisine de bir miktar EI verilmiştir. Doz ayarlaması erişkin bir insan (yaklaşık olarak 70 kg), günde 1 kutu (RedBull® , Türkiye) 250 ml enerji ieeği kullandığı varsayılararak yapılmıştır (14). Kontrol grubuna ise aynı zamanda başlanarak aynı dozda, aynı sürede ve aynı şekilde olmak üzere distile su (DS) verilmiştir (Fotoğraf 3.6, 3.7)



Fotoğraf 3.6. Kullanılan distile su



Fotoğraf 3.7. Gavaj uygulaması

Sıçanlar 15. günde sakrifiye edilerek incelenmek üzere maksillaları alınıp, %10'luk nötral formaldehit solüsyonunda fikse edilmiştir. Ayrıca sakrifiye edilirken alınan kardiyak kan örneklerinde belirlenen biyokimyasal parametrelere bakılmıştır.

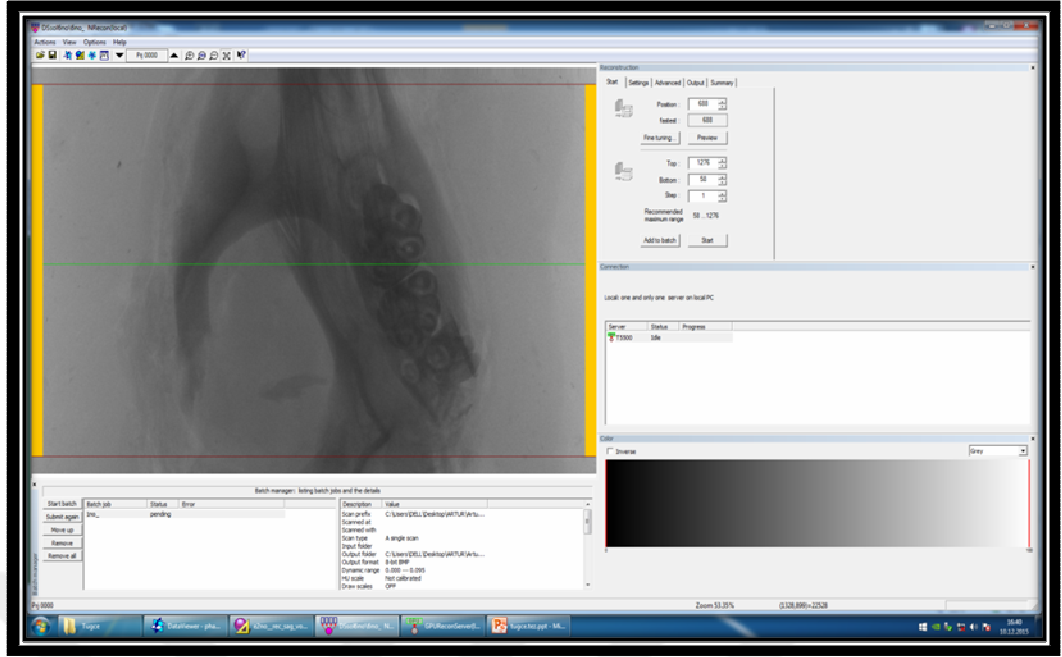
3.5. Mikro Bilgisayarlı Tomografi (Mikro BT) Değerlendirmeleri

Sakrifikasyondan sonra dişeti dokuları alınan random üst yarım çeneler, %10'luk formaldehit solüsyonunda fikse edildi. Deneklerin üst 2. molar periodontal dokularının alveol kemiği boyut ve mineral yoğunluğunun ölçülmesi M-CT yöntemi ile yapıldı. Rotasyonel tarama sırasında X ışın tüpü ile incelenen örnek arasındaki mesafeyi değiştirecek ve incelenen örneğin ekspoz alanının dışına çıkmasına neden olabilecek aksiyel konumlardaki sapmaları önlemek için sabitleme işlemi sırasında incelenen örneğin vertikal olarak olabildiğince merkezi, açılanma yapmadan yerleştirilmesine dikkat edildi. Daha sonra tarama işlemine geçildi.

Örnekler SkyScan1172 compact Micro CT (Kontich, Belgium) (Fotoğraf 3.9) cihazına yerleştirilerek 100 kV ve 100 mA güç, 0,5 mm alüminyum filtre, 11 Mega Piksel kamera yardımıyla, her bir örnekten 13-14 mikron kalınlığında toplam 400-450 kesit alınarak tarandı. Örnekler 360⁰ rotasyon ile taranırken, rotasyon adımı 0.40⁰ olarak belirlendi. Kesitlerden alınan Digital Imaging and Communication in Medicine (DICOM) uyumlu görüntüler Bit Map Picture (BMP) formatına dönüştürüldü. M-CT taraması sonrası elde edilen ham radyolojik görüntülerde N Recon 1.6.9.4 SkyScan, Contich, Belgium programı kullanılarak görüntü kirlilikleri ve radyolojik artefaktlar elimine edildi ve matematiksel analiz için hazır hale getirildi (Şekil 3.3).

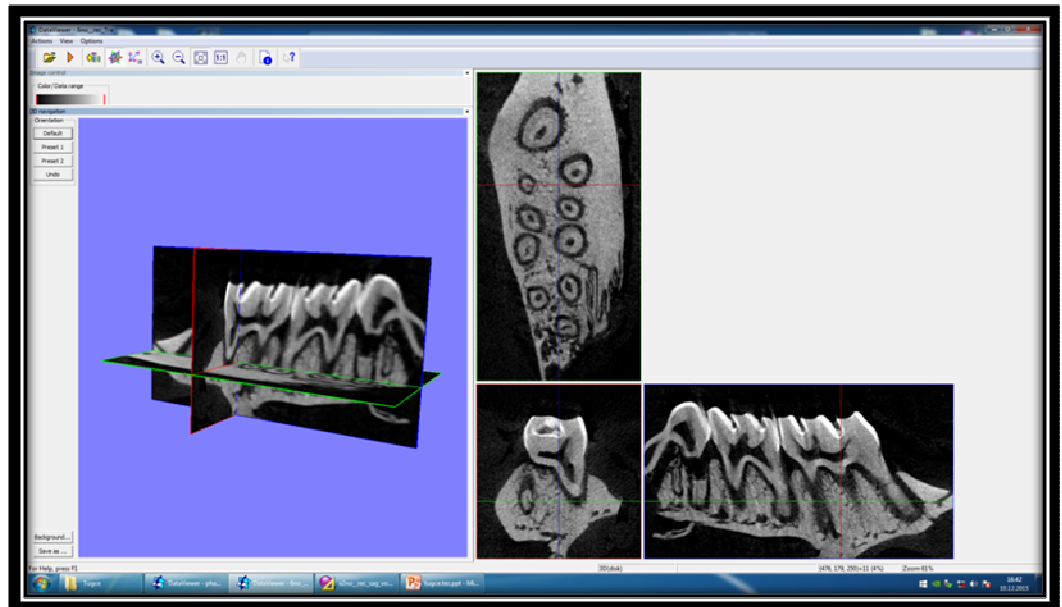


Fotoğraf 3.9. Mikro BT Cihazı (SkyScan 1172, Belçika, 2012)



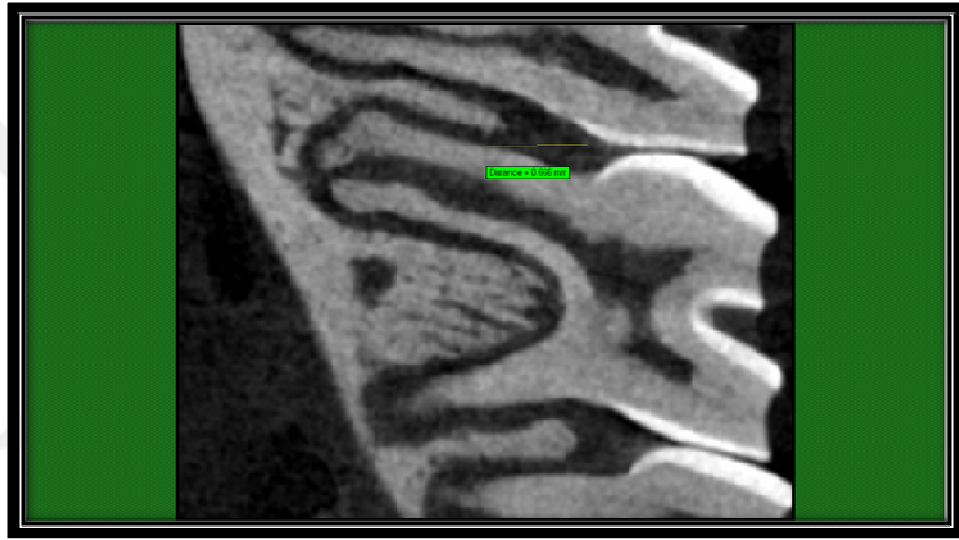
Şekil 3.3. Ham radyolojik görüntülerin matematiksel analiz için hazır hale getirilmesi

İşlenen radyolojik görüntüler ScyScan Data Wiever 1.5.0 64 bit SkyScan, Contich, Belgium programı kullanılarak uzayın her 3 düzleminde yeniden konumlandırıldı ve radyolojik görüntü alanları dışındaki alanlar uzaklaştırılarak boyutları matematiksel analizin daha hızlı yapılabilmesi için küçültüldü (Şekil 3.4).

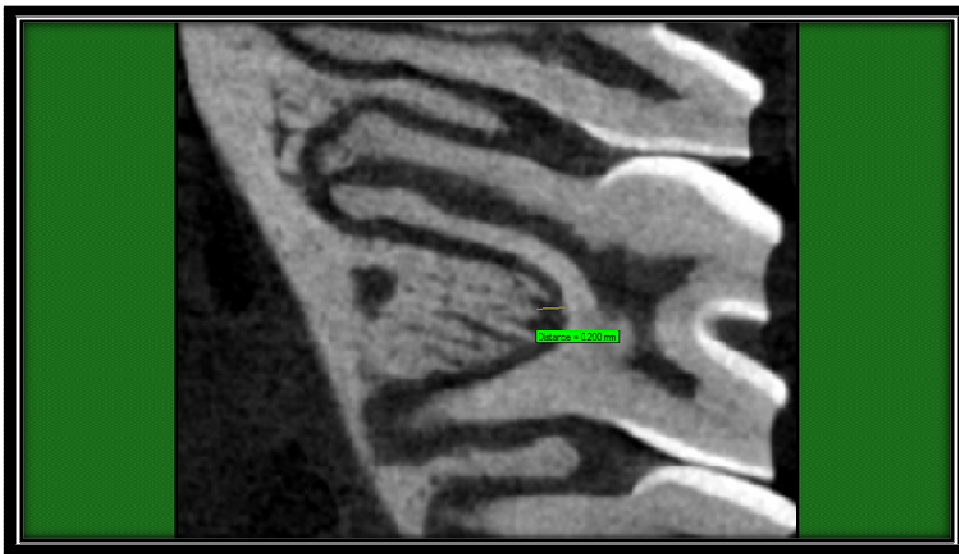


Şekil 3.4. Radyolojik görüntülerin 3 düzlemde yeniden konumlandırılması ve küçültülmesi

Elde edilen yeni veri serisi CT-AN 1.13.5.1 (SkyScan, Contich, Belgium) programına yüklendi ve sagittal kesitlerde ilk ve son kesit belirlendi. İlk aşamada; seçilen kesit aralığındaki kesit sayısı dikkate alındı ve 6 adet kesitte programın lineer uzaklık ölçüm fonksiyonu kullanılarak Mezial Mine Sement Sınırı (MMSS)-Mezial Krestal Kemik (MKK) (Şekil 3.5), Furkasyon Çatısı (FÇ)-Furkasyon Krestal Kemik (FKK) (Şekil 3.6), Distal Mine Sement Sınırı (DMSS)-Distal Krestal Kemik (DKK) (Şekil 3.7) arası mesafeler ölçüldü. Her bir örnekten alınan 3 ölçümün ortalamaları alındı.



Şekil 3.5. MMSS-MKK arasındaki mesafenin ölçülmesi

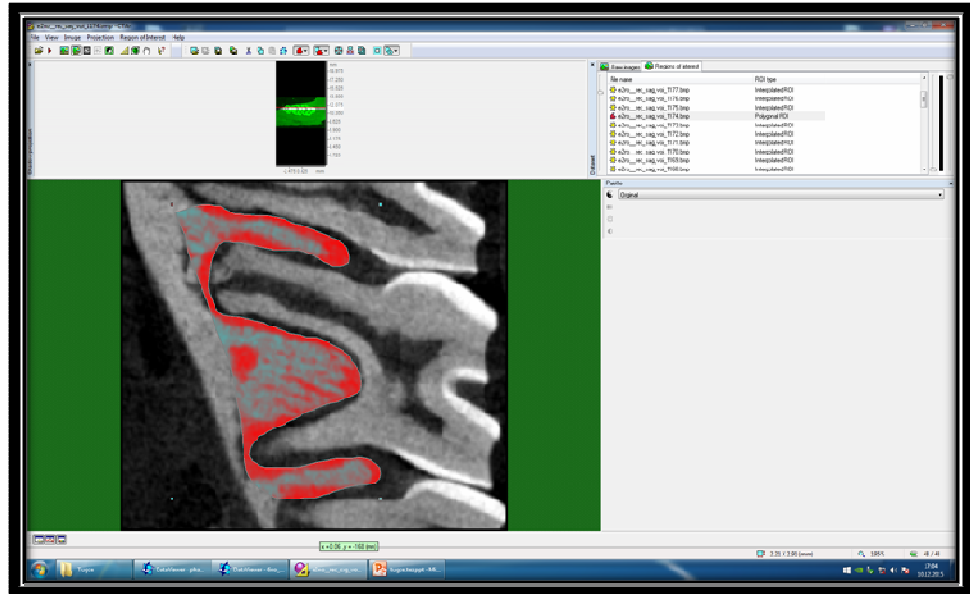


Şekil 3.6. FÇ-FKK arasındaki mesafenin ölçülmesi

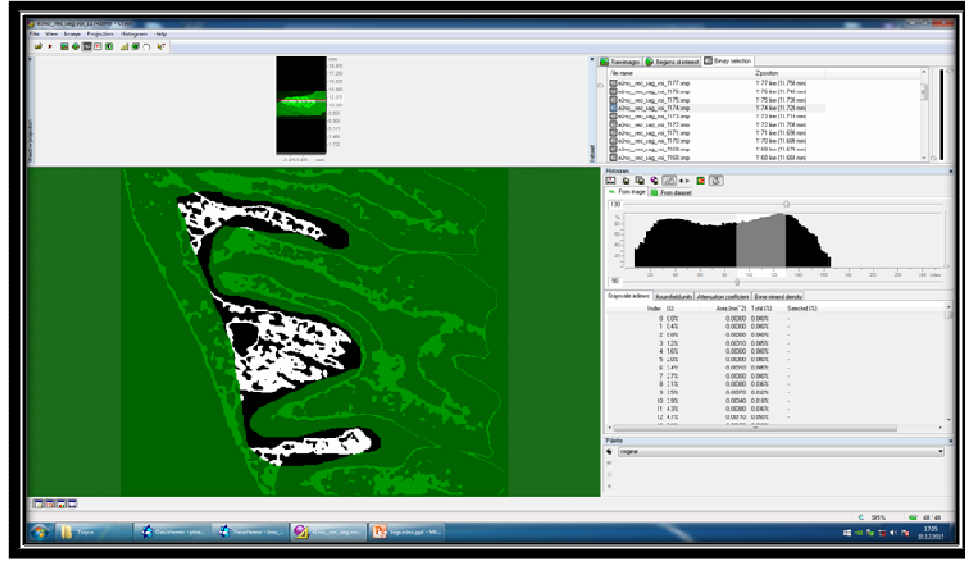


Şekil 3.7. DMSS-DKK arası mesafenin ölçülmesi

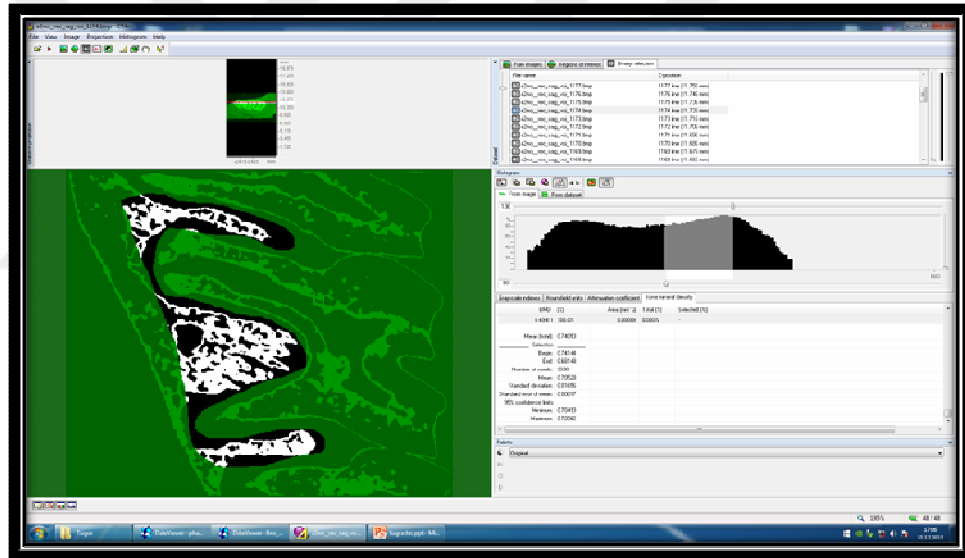
İkinci aşamada; alveolar kemik bölgesi CTAN programında Bölgesel Ayırıştırma (Region of Interest) fonksiyonu seçilerek ilgili kemik bölgesi belirlendi (Şekil 3.8). Daha sonra Binary Page sayfasına geçilip uygun Thresholding fonksiyonuyla kemik alanları belirlendi (Şekil 3.9) ve kemik mineral yoğunluğu ve mikro yapı tespit edildi (Şekil 3.10, Şekil 3.11).



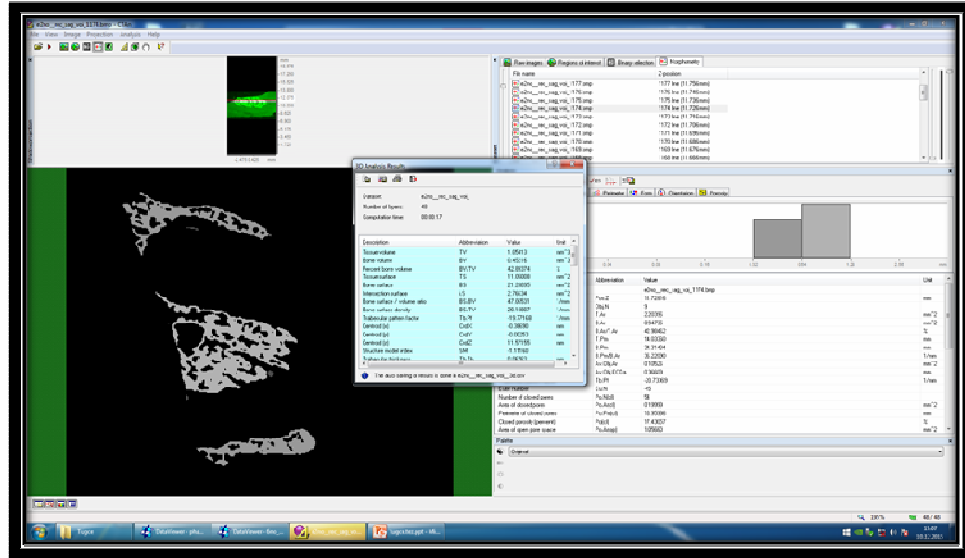
Şekil 3.8. CTAN programında alveolar kemik bölgesinin seçilmesi



Şekil 3.9. CTAN programında kemik alanlarının belirlenmesi.



Şekil 3.10. CTAN programında kemik mineral yoğunluğunun belirlenmesi



Şekil 3.11. CTAN programında kemik mikro yapısının belirlenmesi

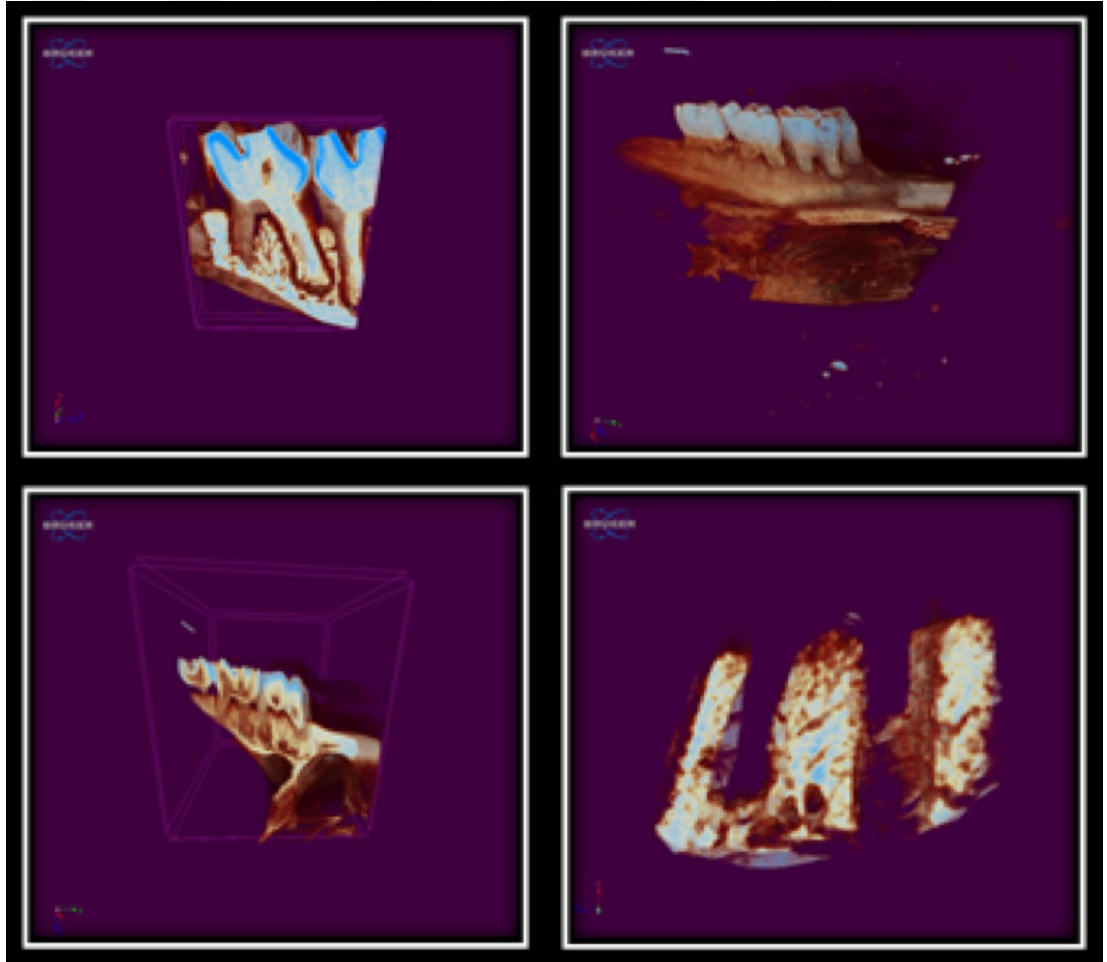
Bu metotta yazılımın ve cihazın hesaplama kapasitesine bağlı olarak çeşitli parametreler hesaplanabilmektedir (207). Bu metot ile hesaplanabilen birincil parametreler aşağıdaki gibidir:

- TV (Doku Hacmi-Tissue Volume-, mm^3): Bütün voksellerin toplamı tarafından ifade edilen ilgili total doku hacmi,
- BV (Kemik Hacmi-Bone Volume-, mm^3): İlgili doku alanı içerisindeki kemik olarak işaretlenmiş bütün voksellerin toplamı,
- TS (Doku Yüzeyi-Tissue Surface-, mm^2): Bütün pikseller toplamı tarafından ifade edilen ilgili alanın total yüzeyi,
- BS (Kemik Yüzeyi-Bone Surface-, mm^2): İlgili alan içerisinde kemik olarak işaretlenmiş bütün piksellerin toplamı,
- BV/TV (Kemik Hacim Yoğunluğu, Bone Volume Fraction, %): Hacmi yüzde olarak ifade eder ve kemik direnci ile ilgili en önemli ölçümdür,
- BS/BV ($1/\text{mm}$): Spesifik yüzey alanını ifade eder,
- BS/TV (Kemik yüzey yoğunluğu, Bone Surface Density, $1/\text{mm}$): Kemik yüzeyinin yoğunluğunu ifade eder.

İkincil ölçüm olarak hesaplanabilen parametreler ise;

- Tb.Th (Trabekül kalınlığı, Trabecular Thickness, mm): Osseos trabeküllerin kalınlığını,
- Tb.N (Trabekül sayısı, Trabecular Number, mm⁻¹): Trabeküler yoğunluğu ve her bir uzunluktaki trabeküllerin ortalama sayısını,
- Tb.Sp (Trabeküller arası mesafe, Trabecular Separation, mm): Osseos trabekül sınırları arasındaki mesafeyi ifade eder (208).

Elde edilen radyolojik görüntü serisi CT VOX 2.6.0 (SkyScan, Contich, Belgium) kullanılarak 3 boyutlu modeller oluşturuldu (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. Üç boyutlu Mikro BT görüntüleri

3.6. Histometrik Analiz

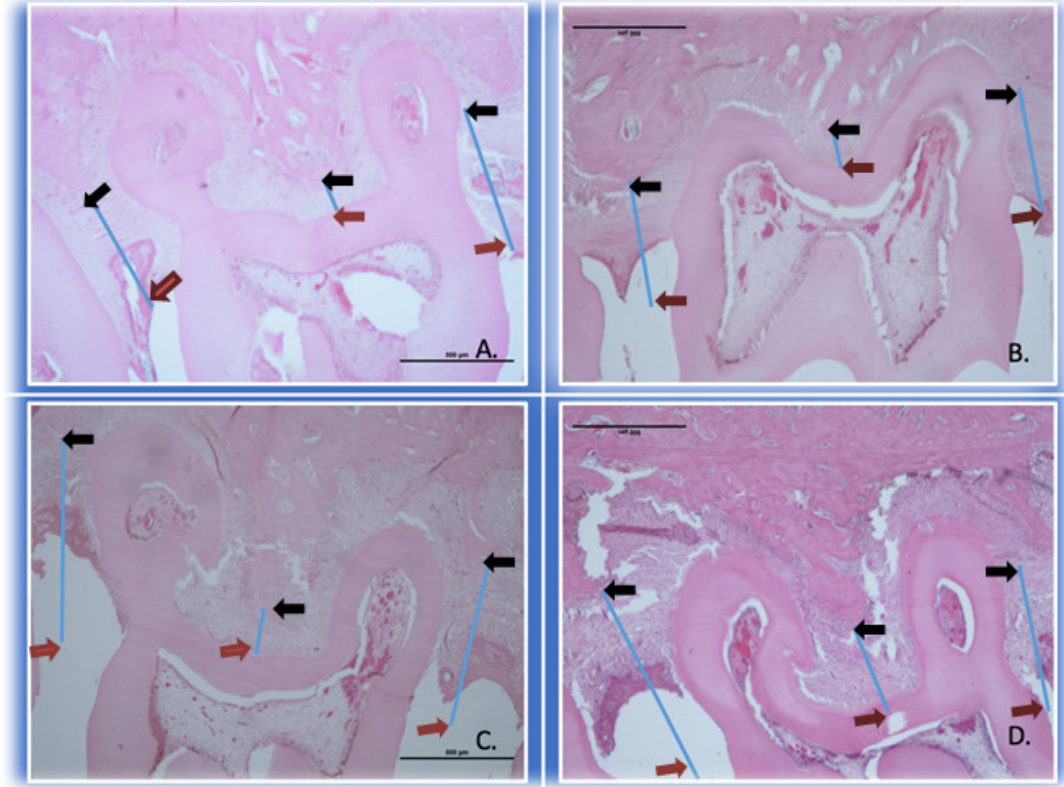
Histometrik olarak aşağıda belirtilen protokolleri takiben alveolar kemik kaybı değerlendirilmiştir. Alveolar kemik kaybı, mine-sement sınırı ve alveolar kemik kreti arasındaki mesafe kaydedilerek ölçülmüştür. Alveolar kemik seviyesini tespit için yapılan ölçümler her diş için alınan 3 kesitin meziyal-mediyal-distal alanlarının ölçümlerinin ortalaması olarak alınmıştır (Şekil 3.13).

Örnekler %10'luk nötral formaldehit solüsyonunda 24-72 saat fikse edilmiştir. Kemik dokusu inceleme için uygun yumuşaklığa ulaşınca kadar formik asitli (Merck Formic acid 98-100% for analysis EMSURE® ACS) dekalsifikasyon solüsyonunda bekletilmiştir ve dekalsifiye edildikten sonra doku takibi yapılarak parafin blokları içerisine gömülmüştür. Mikrotom (Leica ®RM 2125) yardımıyla 3 µm kalınlığında kesitler sagittal ekseninde meziyo-distal yönde elde edilerek polilizinli lamlara alınmıştır. Parafin kesitler 60°C'de etüvde bekletildikten sonra hematoksilin eozin boyası ile aşağıdaki protokole göre boyanmıştır.

1. Ksilol I' de 2 dakika bekletilerek
 2. Ksilol II' de 2 dakika bekletilerek
 3. İki defa %100'lük alkolde birer dakika bekletilerek
 4. İki defa %96'lık alkolde birer dakika bekletilerek
 5. Çeşme suyu altında yıkandı,
 6. Hematoksilin boyasında 3 dakika bekletildi,
 7. Çeşme suyunda yıkandı,
 8. Asit alkole 2 kere daldırıldı,
 9. Çeşme suyunda yıkandı,
 10. Amonyaklı suda 10-15 saniye bekletildi,
 11. Çeşme suyunda yıkandı,
 12. %80'lik alkolde bir dakika bekletildi,
 13. Eozin boyasında bir dakika bekletildi,
 14. 2 defa %96'lık alkolde ikişer dakika bekletildi,
 15. 2 defa %100'lük alkolde ikişer dakika bekletildi,
- kesitler deparafinize edildi.
- kesitler dehidrate edildi.

16. Ksilolde 10 dakika bekletilip çıkarıldıktan sonra lamlara entellan damlatılarak lamel ile kapatıldı.

Yukarıdaki protokolü takiben elde edilen hematoksinen eozin boyalı kesitlerde ilgili alanlardaki lineer değişiklikler ışık mikroskobu altında (Nikon ECLİPSE 80i) incelenmiştir.



Şekil 3.13. Alveolar kemik kaybının ölçümü

A. S_DS grubu B. S_Eİ grubu C. DP_DS grubu D. DP_Eİ grubu. ➡ Mine-sement sınırı (MSS), ➡ Alveoler kret tepesi (AKT), — MSS ile AKT arasındaki mesafe ölçümü

3.7. İmmünohistokimyasal Analiz

Hazırlanan parafin bloklardan polizinli lamlara 3 µm (mikron) kalınlığında kesitler alındı. Kemik dokusunda yıkım ve yapımda aktif rol oynayan osteoblast ve osteoklast hücrelerini işaretlemek amacı ile OPG (Osteoprotegerin SANTA CRUZ OPG (N-20): sc-8468) ve RANKL (Reseptor Activator of NF-kB Ligand SANTA

CRUZ RANKL (N-19): sc-7628) kitleri kullanılarak immünohistokimyasal boyama yapıldı.

Polizinli lamlara alınan 3 mikron kalınlığındaki kesitler bir gece boyunca 37°C'lik etüvde bekletildi.

Birinci gün :

1. 3 kere 5'er dakika ksilende bekletildi.
2. 5 dakika %100'lük alkol,
3. 5 dakika %96'lık alkol,
4. 5 dakika %80'lik alkol,
5. 5 dakika %70'lik alkol de bekletildi.
6. 3 dakika distile suda yıkandı.
7. 3 dakika fosfat tampon solüsyonunda (Phosphate Buffered Saline, PBS) yıkandı.
8. Lamlar, içinde pH'sı 6.0 olan 0.1 M 200 ml sitrat tampon solüsyonu bulunan dayanıklı plastik kaplara konularak 2'şer kere 350 Watt'da 5 dakika mikrodalgada kaynatıldı.
9. Dokuların etrafı pappen ile çizildi.
10. Kesitler 2 defa PBS ile yıkandı.
11. 10 dakika protein blok uygulandı.
12. 1 defa PBS ile yıkandı.
13. Primer antikorun uygulanması: Antikor diluent ile sulandırılmış primer antikorlar (OPG ve RANKL) her bir doku üzerine 1000 mikrolitre koyuldu.
14. Primer antikorlu olan dokuların üzerileri parafin filmler ile kapatılarak kurumaması için kapaklı ve nemli kaba koyuldu ve +4°C'de 1 gece bekletildi.

İkinci gün:

15. +4°C'de bir gece bekletilen dokular 2 kere 5'er dakika PBS ile yıkandı.
16. Dokuların üzerine 100 mikrolitre hidrojen peroksit damlatılarak 10 dakika bekletildi.
17. Doku kesitleri 3 kere 5'er dakika PBS ile yıkandı.
18. Kitin içinde bulunan blocking serum stok, biotinylated sekonder antibody

(ImmunoCruz goat ABC staining system: sc-2023) ve PBS karıştırılarak dokuların üzerinde 30 dakika bekletildi.

19. Dokular 3 kere 5'er dakika PBS ile yıkandı.
20. Reagent A (avidin), Reagent B (biotinylated HRP) ve PBS ile hazırlanan AB karışımı ile dokular 30 dakika boyunca inhibe edildi.
21. 3 kere 5'er dakika PBS ile yıkandı.
22. Dokular 10dakika boyunca hazırlanan peroksidaz substrat (1.6 ml distile su + 5 damla 10x substrate buffer+ 1 damla DAB chromogen KIT + 1 damla peroksidaz substrate) ile inkübe edildi.
23. Kesitler distile su ile yıkandı.
24. Dokuların üzerine Mayer's hematoxilen damlatılarak 5-10 saniye boyunca zıt boyama yapıldı.
25. Dokular distile su ile yıkandı.
26. Dokular alkol serilerinden 5'er dakika geçirilerek (%50-%70-%80-%96-%96-%100) dehidrate edildi, 2 ayrı ksilende 5'er dakika bekletildi.
27. Son olarak kesitler entellan ile kapatıldı.

Yukarıdaki protokolü takiben elde edilen immünohistokimyasal boyalı kesitlerde ilgili alanlardaki alan başına düşen RANKL ve OPG ile işaretlenmiş osteoblast ve osteoklastlar ışık mikroskobu altında (Nikon ECLİPSE 80i) sayıldı ve hesaplandı.

3.8. Biyokimyasal Analiz

Biyokimyasal analiz için, sıçanlar anestezi altındayken açık yöntem ile kardiyak kan örnekleri toplanmış ve ötenaziyi hızlandırmak için aort kesilerek sakrifikasyon gerçekleştirilmiştir. Alınan kan örnekleri sarı kapaklı 5 ml'lik jelli vakumlu serum separator tüpü (SST) içerisine alınarak standart koşullarda santrifüj edilmiştir (4000 rpm, 10 dakika). Oluşan serum örnekleri ependorf tüplerine alınarak biyokimyasal inceleme için -80°C'ye aktarılmıştır. İnceleme yapılacağı gün çözdürülen serum örneklerinde; sıçan serum RANKL, OPG, anjiyogenez ve yeni doku oluşumu göstergesi olan VEGF ve bFGF bakılmıştır. Bu belirteçlerin tespitinde 'Özel Enzim Bağlı İmmünosorbent Analizi' (spesifik enzim-linked immunosorbant

assay, ELISA) yöntemi kullanılmıştır. Reaktif olarak orjinal Elabscience (Elabscience Biotechnology Co. Ltd.; WuHan; P.R.C.) kitleri üretici firmanın talimatlarına uygun olarak kullanılmıştır. Tüm parametrelerin birimi pg/ml'dir.

3.9. İstatistiksel Analizler

Deneysel çalışma sonrasında elde edilen mikro bilgisayarlı tomografi, biyokimyasal ve histolojik veriler istatistiksel olarak değerlendirildi. Değerlendirme “SPSS for Windows 17.0” paket programı kullanılarak yapıldı. Non-parametrik dağılım gösteren veriler Kruskal Wallis, gruplar arası farkın önem denetimi ise Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Parametrik dağılım gösteren veriler için ise grupların kendi içinde değerlendirilmesi One Way Anova, gruplar arası farkın önem denetimi ise Post Hoc testlerinden Tukey ve Benferroni ile değerlendirildi.

Çalışılan her bir değişken için dış başına tek değer elde edilmiştir. Sonuçlar; ortalama, standart sapma, maksimum ve minimum olarak verilmiştir. Sonuçlar %5 seviyesinde çıkarsa ($p < 0.05$) anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Mikro Bilgisayarlı Tomografi Verilerinin Değerlendirilmesi

Alınan kemik dokusu örneklerinin değerlendirilmesi amacıyla doku hacmi (Tissue Volume=TV), kemik hacmi (Bone Volume=BV), kemik hacim fraksiyonu (BV/TV, PBV), trabeküler kalınlık (Tb.Th), trabeküler seperasyon (Tb.Sp), trabekül sayısı (Tb.N), kemik mineral yoğunluğu (bone mineral density, BMD) parametreleri ve lineer kemik kaybı ortalaması mikrobilgisayarlı tomografi ile değerlendirilmiştir.

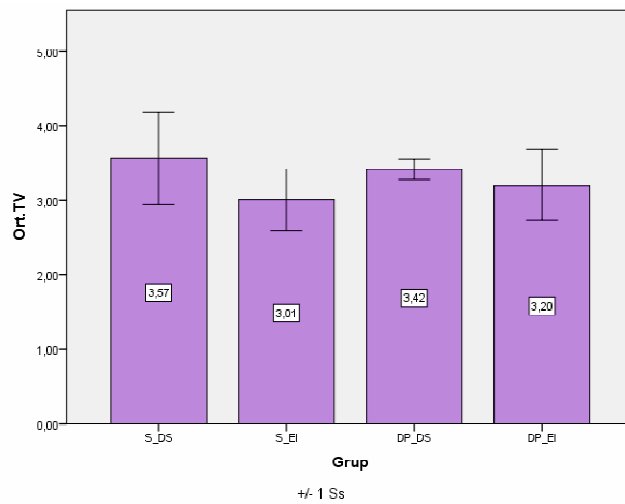
4.1.1. Doku hacmi (Tissue Volume, TV)

Grupların TV değerleri birbiri ile karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p>0.05$) (Tablo 4.1) (Grafik 4.1).

Tablo 4.1. Grupların TV dağılımları

TV	Sağlıklı Distile Su	Sağlıklı Enerji İçeceği	Deneyisel Periodontisli Distile Su	Deneyisel Periodontisli Enerji İçeceği	<i>p</i>
Ort±Ss	3.56±0.62	3.01±0.41	3.41±0.13	3.20±0.47	0.094
(Min-Max)	(2.79-4.74)	(2.34-3.61)	(3.18-3.59)	(2.41-3.71)	

(TV: Tissue Volume-Doku hacmi, Ort: Ortalama, Ss: Standart sapma, Min: minimum, Max: maksimum, $p>0.05$: anlamlılık yok)



Grafik 4.1. Ortalama TV değerlerinin karşılaştırılması

4.1.2. Kemik hacmi (Bone Volume, BV)

Kemik hacminin gruplar arasındaki farklılığını değerlendirmek için non-parametrik bir test olan Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır (Tablo 4.2) ve anlamlı farklılık bulunmuştur ($p<0.05$), grupları kendi arasında karşılaştırmak için Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

Tablo 4.2. Grupların BV dağılımları

BV	Sağlıklı Distile Su	Sağlıklı Enerji İçeceği	Deneysel Periodontisli Distile Su	Deneysel Periodontisli Enerji İçeceği	<i>p</i>
Ort±Ss	0.48±0.09	0.41±0.09	0.35±0.08	0.28±0.1	0.003*
(Min-Max)	(0.35-0.68)	(0.27-0.51)	(0.21-0.52)	(0.09-0.40)	

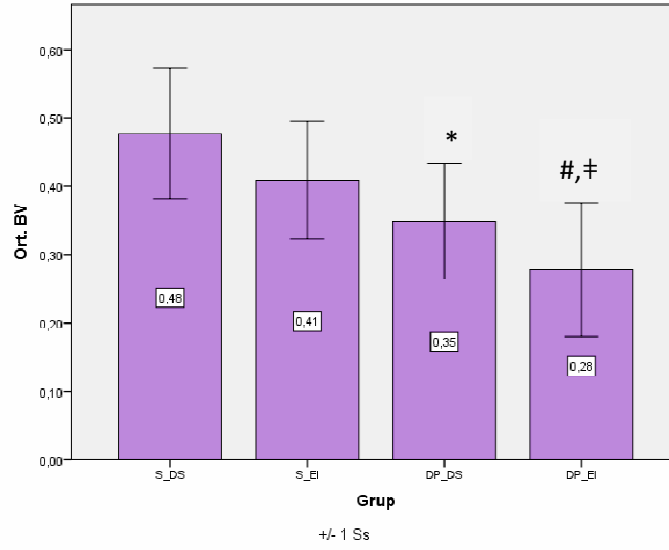
(BV: Bone Volume-Kemik hacmi-, Ort: Ortalama, Ss: Standart sapma, Min: minimum, Max: Maksimum, $*=p<0.05$, istatistiksel olarak anlamlılık)

S_DS ve S_Eİ grupları arasındaki kemik hacminde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p>0.05$). S_DS grubunda ise kemik hacmi DP_DS ($p<0.05$) ve DP_Eİ ($p<0.05$) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı büyük bulunmuştur. DP_Eİ ise DP_DS'ye göre istatistiksel olarak anlamlı küçük olmaya eğilimlidir ($p<0.05$) (Tablo 4.3) (Grafik 4.2).

Tablo 4.3. İkili gruplar arasında BV değerlerinin karşılaştırılması

	Grup	N	Mean Rank	Sum of Ranks	<i>p</i>
BV	S_DS	8	10.00	80.00	0.208
	S_Eİ	8	7.00	56.00	
BV	S_DS	8	11.38	91.00	0.016*
	DP_DS	8	5.63	45.00	
BV	S_DS	8	11.38	91.00	0.002*
	DP_Eİ	7	4.14	29.00	
BV	S_Eİ	8	9.88	79.00	0.248
	DP_DS	8	7.13	57.00	
BV	S_Eİ	8	10.50	84.00	0.021*
	DP_Eİ	7	5.14	36.00	
BV	DP_DS	8	10.00	80.00	0.064
	DP_Eİ	7	5.71	40.00	

(*= $p<0.05$, istatistiksel olarak anlamlılık)



Grafik 4.2. Ortalama BV değerlerinin karşılaştırılması

*: S_DS ve DP_DS grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılık

#: S_DS ve DP_Eİ grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılık

‡: S_Eİ ve DP_Eİ grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılık

4.1.3. Kemik hacim fraksiyonu (Perfect Bone Volume=PBV:BV/TV)

Kemik hacim fraksiyonunun gruplar arasındaki farklılığını değerlendirmek için non-parametrik bir test olan Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır (Tablo 4.4) ve anlamlı farklılık bulunmuştur ($p<0.05$), grupları kendi arasında karşılaştırmak için Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

Tablo 4.4. Grupların PBV dağılımları

PBV	Sağlıklı Distile Su	Sağlıklı Enerji İçeceği	Deneyisel Periodontitisli Distile Su	Deneyisel Periodontitisli Enerji İçeceği	<i>p</i>
Ort±Ss	13.44±1.69	13.52±1.72	10.18±2.21	8.50±2.54	0.000*
(Min-Max)	(10.92-16.32)	(10.39-15.51)	(6.27-14.48)	(3.64-11.35)	

(PBV: Perfect Bone Volume- kemik hacim yoğunluğu-, Ort: Ortalama, Ss: Standart sapma, Min: Minimum, Max: Maksimum, *= $p<0.05$, istatistiksel olarak anlamlılık)

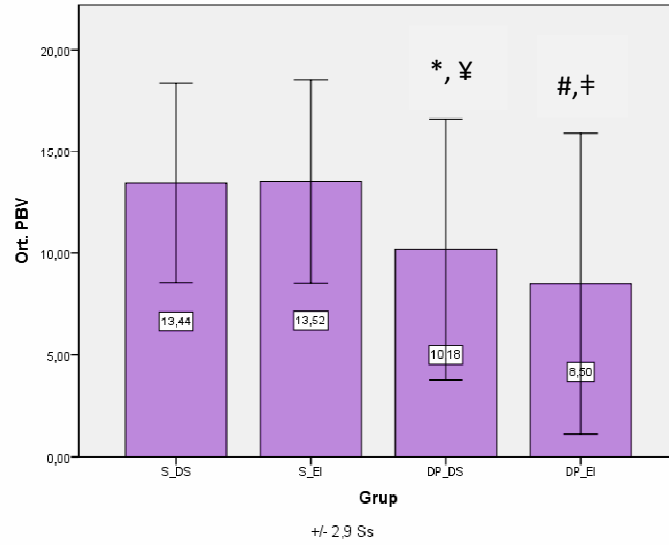
S_DS ve S_Eİ grupları arasında kemik hacim fraksiyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p>0.05$). S_DS grubunda ise kemik hacim fraksiyonu DP_DS ($p<0.05$) ve DP_Eİ ($p<0.05$) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı büyük bulunmuştur. S_Eİ gruplarında da PBV DP_DS ($p<0.05$) ve

DP_Eİ ($p<0.05$) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı daha büyüktür. DP_Eİ ve DP_DS grupları arasında ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır ($p>0.05$) (Tablo 4.5) (Grafik 4.3).

Tablo 4.5. İkili gruplar arasında PBV değerlerinin karşılaştırılması

	Grup	N	Mean Rank	Sum of Ranks	p
PBV	S_DS	8	8.13	65.00	0.753
	S_Eİ	8	8.88	71.00	
PBV	S_DS	8	11.75	94.00	0.006*
	DP_DS	8	5.25	42.00	
PBV	S_DS	8	11.38	91.00	0.002*
	DP_Eİ	7	4.14	29.00	
PBV	S_Eİ	8	11.75	94.00	0.006*
	DP_DS	8	5.25	42.00	
PBV	S_Eİ	8	11.25	90.00	0.003*
	DP_Eİ	7	4.29	30.00	
PBV	DP_DS	8	9.25	74.00	0.247
	DP_Eİ	7	6.57	46.00	

(* = $p<0.05$, istatistiksel olarak anlamlılık)



Grafik 4.3. Ortalama PBV değerlerinin karşılaştırılması

*: S_DS ve DP_DS grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılık
#: S_DS ve DP_Eİ grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılık
†: S_Eİ ve DP_Eİ grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılık
¥: S_Eİ ve DP_DS grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılık

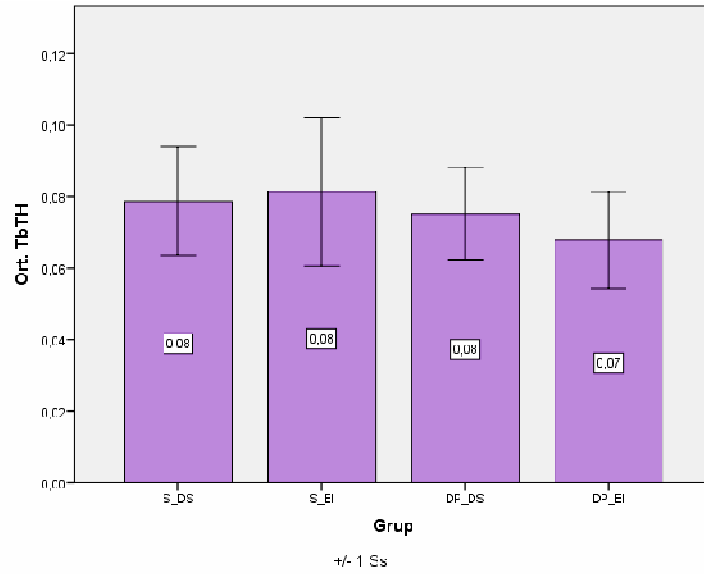
4.1.4. Trabekül kalınlığı (Trabecular thickness, Tb.Th)

Trabekül kalınlığının gruplar arasındaki farklılığını değerlendirmek için parametrik bir test olan One-Way Anova testi kullanılmıştır. Değerlendirme sonrasında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p>0.05$) (Tablo 4.6) (Grafik 4.4).

Tablo 4.6. Grupların Tb.Th dağılımları

Tb.Th	Sağlıklı Distile Su	Sağlıklı Enerji İçeceği	Deneyisel Periodontitisli Distile Su	Deneyisel Periodontitisli Enerji İçeceği	<i>p</i>
Ort±Ss	0.08±0.02	0.08±0.02	0.075±0.01	0.07±0.01	0.408
(Min-Max)	(0.06-0.10)	(0.05-0.11)	(0.06-0.09)	(0.05-0.08)	

(Tb.Th: Trabecular thickness-Trabekül kalınlığı-, Ort: Ortalama, Ss: Standart sapma, Min: Minimum, Max: Maksimum, $p>0.05$: anlamlılık yok)



Grafik 4.4. Ortalama Tb.Th değerlerinin karşılaştırılması

4.1.5. Trabekül sayısı (Trabecular number, Tb.N)

Trabekül sayısının gruplar arasındaki farklılığını değerlendirmek için non-parametrik bir test olan Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır (Tablo 4.7) ve anlamlı farklılık bulunmuştur ($p<0.05$), grupları kendi arasında karşılaştırmak için Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

Tablo 4.7. Grupların Tb.N dağılımları

Tb.N	Sağlıklı Distile Su	Sağlıklı Enerji İçeceği	Deneyisel Periodontitisli Distile Su	Deneyisel Periodontitisli Enerji İçeceği	<i>p</i>
Ort±Ss	1.74±0.21	1.75±0.47	1.38±0.41	1.26±0.38	0.028*
(Min-Max)	(1.46-2.03)	(1.27-2.62)	(1.12-2.35)	(0.79-1.84)	

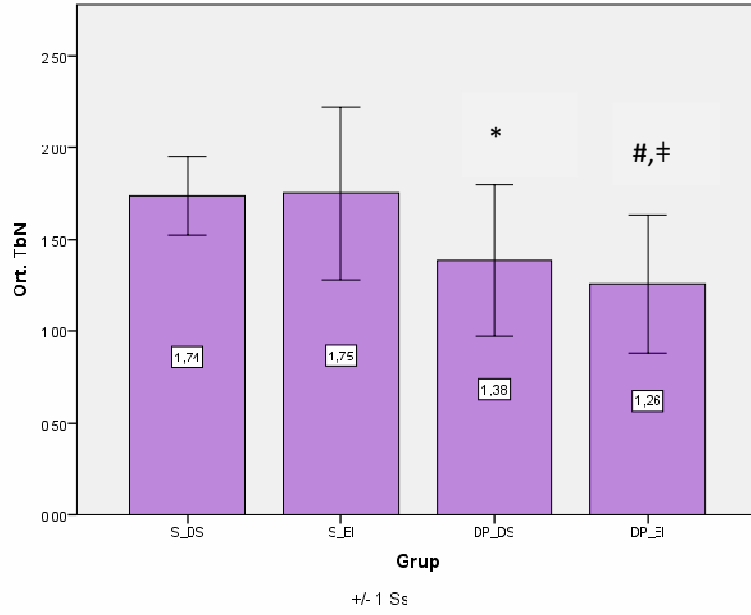
(Tb.N: Trabecular number-Trabekül sayısı-,Ort: Ortalama, Ss: Standart sapma, Min: Minimum, Max: Maksimum, *= $p<0.05$: istatistiksel olarak anlamlılık)

S_DS ve S_Eİ grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır ($p>0.05$), DP_DS ve DP_Eİ'ye kıyasla S_DS istatistiksel olarak anlamlı daha büyüktür ($p<0.05$). S_Eİ, DP_DS'den istatistiksel olarak anlamlı daha büyüktür ($p<0.05$). S_Eİ, DP_DS'den istatistiksel olarak anlamlı daha büyüktür ($p<0.05$). S_Eİ, DP_Eİ grubundan istatistiksel olarak anlamlı büyük olmaya eğilimlidir ($p>0.05$). DP grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktur ($p>0.05$). DP grupları sağlıklı gruplardan anlamlı daha küçüktür (Tablo 4.8) (Grafik 4.5).

Tablo 4.8. İkili gruplar arasında Tb.N değerlerinin karşılaştırılması

	Grup	N	Mean Rank	Sum of Ranks	<i>P</i>
Tb.N	S_DS	8	9.00	72.00	0,674
	S_Eİ	8	8.00	64.00	
Tb.N	S_DS	8	11.25	90.00	0.021*
	DP_DS	8	5.75	46.00	
Tb.N	S_DS	8	10.25	82.00	0.037*
	DP_Eİ	7	5.43	38.00	
Tb.N	S_Eİ	8	10.88	87.00	0.046*
	DP_DS	8	6.13	49.00	
Tb.N	S_Eİ	8	10.00	80.00	0.064
	DP_Eİ	7	5.71	40.00	
Tb.N	DP_DS	8	9.00	72.00	0.355
	DP_Eİ	7	6.86	48.00	

(*= $p<0.05$, istatistiksel olarak anlamlılık)



Grafik 4.5. Ortalama Tb.N değerlerinin karşılaştırılması

*: S_DS ve DP_DS grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılık

#: S_DS ve DP_Eİ grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılık

‡: S_Eİ ve DP_DS grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılık

4.1.6. Trabeküller arası mesafe (Trabecular separation, Tb.Sp)

Trabeküller arası mesafenin gruplar arasındaki farklılığını değerlendirmek için non-parametrik bir test olan Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır (Tablo 4.9) ve anlamlı farklılık bulunmuştur ($p < 0.05$), grupları kendi arasında karşılaştırmak için Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

Tablo 4.9. Grupların Tb.Sp dağılımları

Tb.Sp	Sağlıklı Distile Su	Sağlıklı Enerji İçeceği	Deneyisel Periodontitisli Distile Su	Deneyisel Periodontitisli Enerji İçeceği	<i>p</i>
Ort±Ss	0.4±0.02	0.37±0.04	0.42±0.01	0.41±0.02	0.001*
(Min-Max)	(0.36-0.42)	(0.28-0.41)	(0.41-0.44)	(0.39-0.44)	

(Tb.Sp: Trabecular separation-Trabeküller arası mesafe-,Ort: Ortalama, Ss: Standart sapma, Min: Minimum, Max: Maksimum, *= $p < 0.05$: istatistiksel olarak anlamlılık)

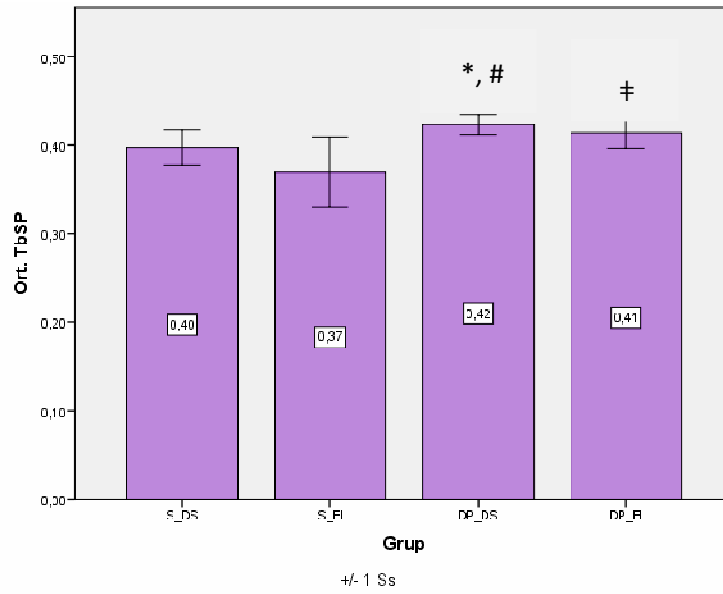
S_DS ve S_Eİ grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p > 0.05$). S_DS grubu DP_DS grubundan istatistiksel olarak anlamlı daha küçüktür ($p < 0.05$). S_Eİ grubu DP_DS ve DP_Eİ gruplarından istatistiksel

olarak anlamlı daha büyüktür ($p<0.05$). DP_DS ve DP_Eİ grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır ($p>0.05$) (Tablo 4.10) (Grafik 4.6).

Tablo 4.10. İkili gruplar arasında Tb.Sp değerlerinin karşılaştırılması

	Grup	N	Mean Rank	Sum of Ranks	P
Tb.Sp	S_DS	8	10.63	85.00	0.074
	S_Eİ	8	6.38	51.00	
Tb.Sp	S_DS	8	5.13	41.00	0.005*
	DP_DS	8	11.88	95.00	
Tb.Sp	S_DS	8	10.25	82.00	0.132
	DP_Eİ	7	5.43	38.00	
Tb.Sp	S_Eİ	8	4.50	36.00	0.001*
	DP_DS	8	12.50	100.00	
Tb.Sp	S_Eİ	8	5.00	40.00	0.005*
	DP_Eİ	7	11.43	80.00	
Tb.Sp	DP_DS	8	9.13	73.00	0.298
	DP_Eİ	7	6.71	47.00	

(*= $p<0.05$, istatistiksel olarak anlamlılık)



Grafik 4.6. Ortalama Tb.Sp değerlerinin karşılaştırılması

*: S_DS ve DP_DS grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılık

#: S_Eİ ve DP_DS grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılık

‡: S_Eİ ve DP_Eİ grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılık

4.1.7. Kemik mineral yoğunluğu (Bone Mineral Density, BMD)

Kemik mineral yoğunluğunun gruplar arasındaki farklılığını değerlendirmek için parametrik bir test olan One-Way Anova testi kullanılmıştır (Tablo 4.11) ve anlamlı farklılık bulunmuştur ($p<0.05$). Benforrini ve Tukey post-hoc testleri ile gruplar arasındaki anlamlılık test edilmiştir (Tablo 4.12).

Tablo 4.11. Grupların BMD dağılımları

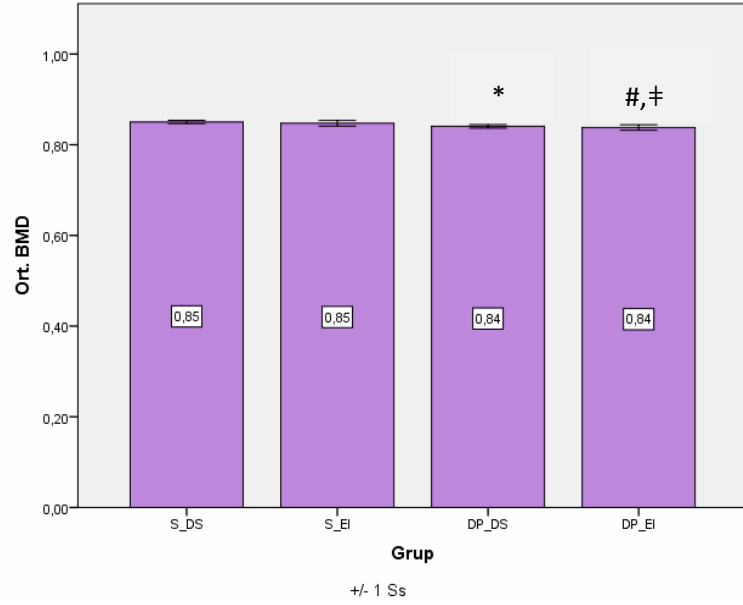
BMD	Sağlıklı Distile Su	Sağlıklı Enerji İçeceği	Deneysel Periodontitisli Distile Su	Deneysel Periodontitisli Enerji İçeceği	<i>p</i>
Ort±Ss	0.85±0.003	0.847±0.006	0.841±0.004	0.838±0.007	00.000*
(Min-Max)	(0.85-0.86)	(0.83-0.86)	(0.83-0.85)	(0.83-0.85)	

(BMD: Bone Mineral Density-kemik mineral yoğunluğu, Ort: Ortalama, Ss: Standart sapma, Min: Minimum, Max: Maksimum, *= $p<0.05$: istatistiksel olarak anlamlılık)

Sağlıklı ve DP'li grupların kendi aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır ($p<0.05$). DP'li gruplar isesağlık gruplarından istatistiksel olarak anlamlı daha küçük bulunmuştur ($p<0.05$) (Grafik 4.7).

Tablo 4.12. Gruplar arasında BMD değerlerinin karşılaştırılması

	(I) Grup	(J) Grup	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Tukey HSD	S_DS	S_EI	.00314	.00259	.624
		DP_DS	.00982*	.00259	.004
		DP_EI	.01261*	.00268	.000
	S_EI	S_DS	-.00314	.00259	.624
		DP_DS	.00667	.00259	.070
		DP_EI	.00946*	.00268	.008
	DP_DS	S_DS	-.00982*	.00259	.004
		DP_EI	-.00667	.00259	.070
		DP_DS	.00279	.00268	.727
	DP_EI	S_DS	-.01261*	.00268	.000
		S_EI	-.00946*	.00268	.008
		DP_DS	-.00279	.00268	.727
Bonferroni	S_DS	S_EI	.00314	.00259	1.000
		DP_DS	-.00982*	.00259	.005
		DP_EI	-.01261*	.00268	.000
	S_EI	S_DS	-.00314	.00259	1.000
		DP_DS	.00667	.00259	.094
		DP_EI	.00946*	.00268	.009
	DP_DS	S_DS	-.00982*	.00259	.005
		S_EI	-.00667	.00259	.094
		DP_EI	.00279	.00268	1.000
	DP_EI	S_DS	-.01261*	.00268	.000
		S_EI	-.00946*	.00268	.009
		DP_DS	-.00279	.00268	1.000



Grafik 4.7. Ortalama BMD değerlerinin karşılaştırılması

*: S_DS ve DP_DS grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılık

#: S_DS ve DP_Eİ grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılık

‡: S_Eİ ve DP_Eİ grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılık

4.1.8. KKO (Kemik Kaybı Ortalaması)

Kemik kaybı ortalamasının gruplar arasındaki farklılığını değerlendirmek için parametrik bir test olan One-Way Anova testi kullanılmıştır (Tablo 4.13) ve anlamlı farklılık bulunmuştur ($p < 0.05$). Benforrini ve Tukey post-hoc testleri ile gruplar arasındaki anlamlılık test edilmiştir (Tablo 4.14).

Tablo 4.13. Grupların KKO dağılımları

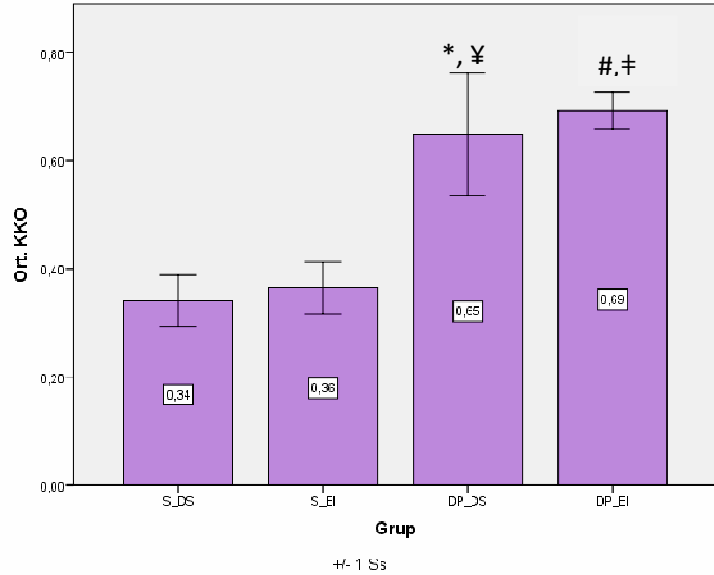
KKO	Sağlıklı Distile Su	Sağlıklı Enerji İçeceği	Deneyisel Periodontitisli Distile Su	Deneyisel Periodontitisli Enerji İçeceği	<i>p</i>
Ort±Ss	0.34±0.05	0.36±0.05	0.65±0.11	0.69±0.33	0.000*
(Min-Max)	(0.38-0.42)	(0.30-0.43)	(0.46-0.77)	(0.65-0.74)	

(KKO: Kemik kaybı ortalaması, Ort:Ortalama, Ss: Standart sapma, Min: Minimum, Max: Maksimum, *= $p < 0.05$: istatistiksel olarak anlamlılık)

S_DS-S_Eİ ve DP_DS-DP_Eİ gruplarının kendi içlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamazken, DP grupları sağlıklı gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı daha büyük bulunmuştur ($p < 0.05$) (Grafik 4.8).

Tablo 4.14. Gruplar arasında KKO değerlerinin karşılaştırılması

	(I) Grup	(J) Grup	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Tukey HSD	S_DS	S_EI	-.02350	.03470	.905
		DP_DS	-.30800*	.03470	.000
		DP_EI	-.35164*	.03592	.000
	S_EI	S_DS	.02350	.03470	.905
		DP_DS	-.28450*	.03470	.000
		DP_EI	-.32814*	.03592	.000
	DP_DS	S_DS	.30800*	.03470	.000
		S_EI	.28450*	.03470	.000
		DP_EI	-.04364	.03592	.623
	DP_EI	S_DS	.35164*	.03592	.000
		S_EI	.32814*	.03592	.000
		DP_DS	.04364	.03592	.623
Bonferroni	S_DS	S_EI	-.02350	.03470	1.000
		DP_DS	-.30800*	.03470	.000
		DP_EI	-.35164*	.03592	.000
	S_EI	S_DS	.02350	.03470	1.000
		DP_DS	-.28450*	.03470	.000
		DP_EI	-.32814*	.03592	.000
	DP_DS	S_DS	.30800*	.03470	.000
		S_EI	.28450*	.03470	.000
		DP_EI	-.04364	.03592	1.000
	DP_EI	S_DS	.35164*	.03592	.000
		S_EI	.32814*	.03592	.000
		DP_DS	.04364	.03592	1.000



Grafik 4.8. Ortalama KKO değerlerinin karşılaştırılması

*: S_DS ve DP_DS grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılık

#: S_DS ve DP_EI grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılık

‡: S_EI ve DP_EI grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılık

¥: S_EI ve DP_DS grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılık

4.2. Biyokimyasal Parametrelerin Değerlendirilmesi

Elde edilen serum örneklerinde FGF₂, VEGF, RANKL ve OPG değerlerine ‘Enzim Bağlı İmmünosorbent Analizi’ (ELISA) yöntemi ile bakılmıştır. Bulunan tüm değerlerin birimi pikogram/mililitredir (pg/mL).

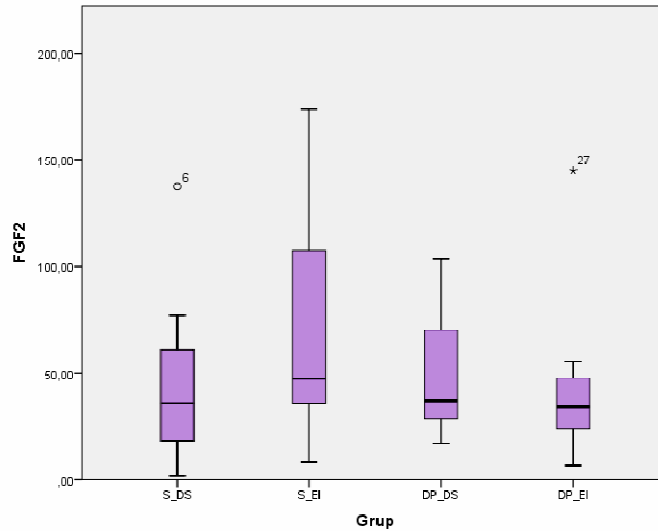
4.2.1. FGF₂ ölçümlerinin değerlendirilmesi

Fibroblast Büyüme Faktörü 2’nin gruplar arasındaki farklılığını değerlendirmek için non-parametrik bir test olan Kruskal Wallis testi kullanılmıştır (Tablo 4.15). Değerlendirme sonrasında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p>0.05$) (Grafik 4.9).

Tablo 4.15. Grupların FGF₂ dağılımları

FGF ₂	Sağlıklı Distile Su	Sağlıklı Enerji İçeceği	Deneyisel Periodontitisli Distile Su	Deneyisel Periodontitisli Enerji İçeceği	<i>p</i>
Ort±Ss	46.29±43.33	70.48±54.71	49.16±29.52	47.01±46.01	0.634
(Min-Max)	(1.83-137.55)	(8.40-173.96)	(17.26-103.68)	(6.82-144.91)	

(FGF₂: Fibroblast Growth Factor 2- Fibroblast Büyüme Faktörü 2-, Ort: Ortalama, Ss: Standart sapma, Min: Minimum, Max: Maksimum, $p>0.05$: İstatistiksel olarak anlamlılık yok)



Grafik 4.9. Ortalama serum FGF₂ değerlerinin karşılaştırılması

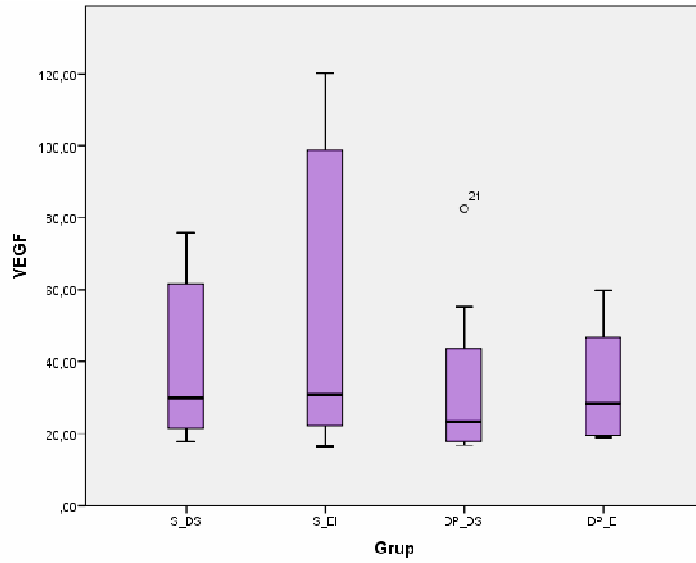
4.2.2. VEGF ölçümlerinin değerlendirilmesi

Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü'nün gruplar arasındaki farklılığını değerlendirmek için parametrik bir test olan One-Way Anova testi kullanılmıştır (Tablo 4.16). Değerlendirme sonrasında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p>0.05$) (Grafik 4.10).

Tablo 4.16. Grupların VEGF dağılımları

VEGF	Sağlıklı Distile Su	Sağlıklı Enerji İçeceği	Deneyisel Periodontitisli Distile Su	Deneyisel Periodontitisli Enerji İçeceği	<i>p</i>
Ort±Ss	39.91±23.46	55.01±43.73	33.61±23.53	34.14±17.38	40.444
(Min-Max)	(17.83-75.78)	(16.36-120.23)	(16.78-82.56)	(18.93-59.83)	

(VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor- Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü-, Ort: Ortalama, Ss: Standart sapma, Min: Minimum, Max: Maksimum, $p>0.05$: İstatistiksel olarak anlamlılık yok)



Grafik 4.10. Ortalama serum VEGF değerlerinin karşılaştırılması

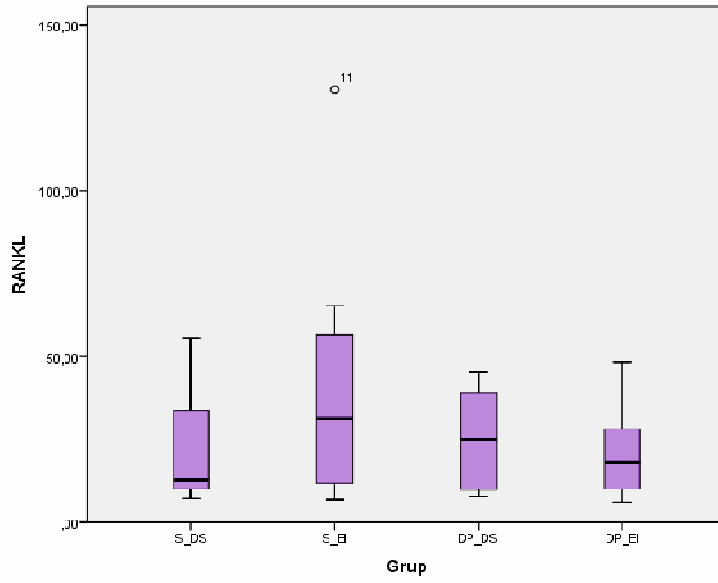
4.2.3. RANKL ölçümlerinin değerlendirilmesi

Reseptör Aktivatör Nükleer Kappa B Ligandın gruplar arasındaki farklılığını değerlendirmek için non-parametrik bir test olan Kruskal Wallis testi kullanılmıştır (Tablo 4.17). Değerlendirme sonrasında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p>0.05$) (Grafik 4.11).

Tablo 4.17. Grupların RANKL dağılımları

RANKL	Sağlıklı Distile Su	Sağlıklı Enerji İçeceği	DeneySEL Periodontitisli Distile Su	DeneySEL Periodontitisli Enerji İçeceği	<i>p</i>
Ort±Ss	21.96±20.22	42.10±41.14	25.15±15.44	21.24±15.02	0.675
(Min-Max)	(7.21-55.35)	(6.87-130.44)	(7.83-45.25)	(6.07-48.33)	

(RANKL: Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand, -Reseptör Aktivatör Nükleer Kappa B Ligand-, Ort: Ortalama, Ss: Standart sapma, Min: Minimum, Max: Maksimum, $p>0.05$: İstatistiksel olarak anlamlılık yok)



Grafik 4.11. Ortalama serum RANKL değerlerinin karşılaştırılması

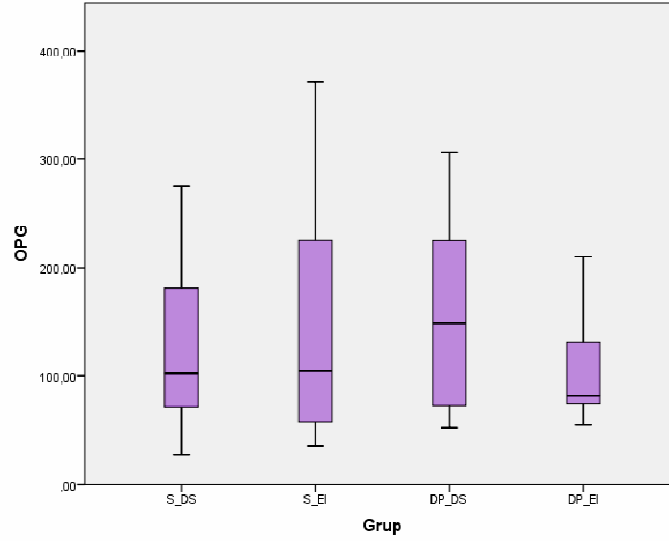
4.2.4. OPG ölçümlerinin değerlendirilmesi

Osteoprotegerin'in gruplar arasındaki farklılığını değerlendirmek için parametrik bir test olan One-Way Anova testi kullanılmıştır (Tablo 4.18). Değerlendirme sonrasında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p>0.05$) (Grafik 4.12).

Tablo 4.18. Grupların OPG dağılımları

OPG	Sağlıklı Distile Su	Sağlıklı Enerji İçeceği	Deneyisel Periodontitisli Distile Su	Deneyisel Periodontitisli Enerji İçeceği	<i>p</i>
Ort±Ss	126.47±82.22	147.69±117.67	156.50±90.90	108.21±59.31	<i>0.734</i>
(Min-Max)	(27.16-275.31)	(35.03-371.19)	(52.09-306.62)	(54.62-209.75)	

(OPG: Osteoprotegerin, Ort: Ortalama, Ss: Standart sapma, Min: Minimum, Max: Maksimum, $p>0.05$: istatistiksel olarak anlamlılık yok)



Grafik 4.12. Ortalama serum OPG değerlerinin karşılaştırılması

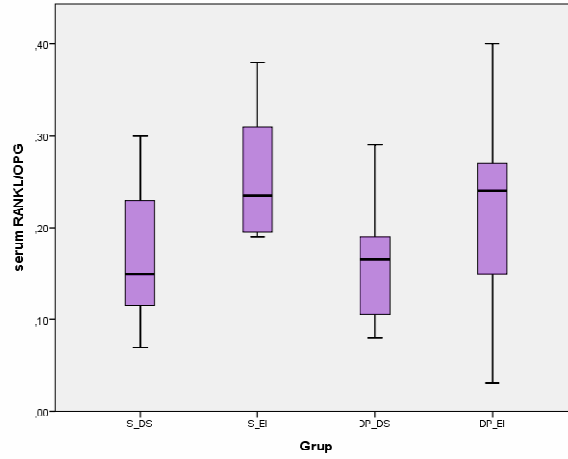
4.2.5. Serum RANKL/OPG oranı ölçümlerinin değerlendirilmesi

Serum RANKL/OPG oranının gruplar arasındaki farklılığını değerlendirmek için parametrik bir test olan One-Way Anova testi kullanılmıştır (Tablo 4.19). Değerlendirme sonrasında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p>0.05$) (Grafik 4.13).

Tablo 4.19. Grupların serum RANKL/OPG oranlarının dağılımları

Serum OPG/RANKL	Sağlıklı Distile Su	Sağlıklı Enerji İçeceği	Deneyisel Periodontitisli Distile Su	Deneyisel Periodontitisli Enerji İçeceği	<i>p</i>
Ort±Ss	0.17±0.08	0.26±0.07	0.16±0.07	0.21±0.13	<i>0.144</i>
(Min-Max)	(0.07-0.30)	(0.19-0.38)	(0.08-0.29)	(0.03-0.40)	

(serum RANKL/OPG oranı, Ort: Ortalama, Ss: Standart sapma, Min: Minimum, Max: Maksimum, $p>0.05$: İstatistiksel olarak anlamlılık yok)



Grafik 4.13. Ortalama serum RANKL/OPG değerlerinin karşılaştırılması

4.3. Histolojik Parametrelerin Değerlendirilmesi

Diş eti ve kemik dokudan alınan alanlardan elde edilen kesitlerde histometrik olarak alveolar kemik kaybı ölçülmüş ve RANKL, OPG, RANKL/OPG oranı değerleri ise immünohistokimyasal olarak hesaplanarak ışık mikroskobu altında (Nikon ECLIPSE 80i/USA) değerlendirilmiştir.

4.3.1. Histometrik veriler

Histolojik olarak hesaplanan alveolar kemik kaybının gruplar arasındaki farklılığını değerlendirmek için non-parametrik bir test olan Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır (Tablo 4.20) ve anlamlı farklılık bulunmuştur ($p < 0.05$). Grupları kendi arasında karşılaştırmak için Mann-Whitney U testi kullanılmıştır (Tablo 4.21).

Tablo 4.20. Grupların AKK dağılımları

AKK	Sağlıklı Distile Su	Sağlıklı Enerji İçeceği	Deneyisel Periodontitisli Distile Su	Deneyisel Periodontitisli Enerji İçeceği	<i>p</i>
Ort±Ss	0.43±0.06	0.48±0.06	0.75±0.09	0.91±0.08	0.000*
(Min-Max)	(0.37-0.56)	(0.40-0.56)	(0.57-0.87)	(0.81-1)	

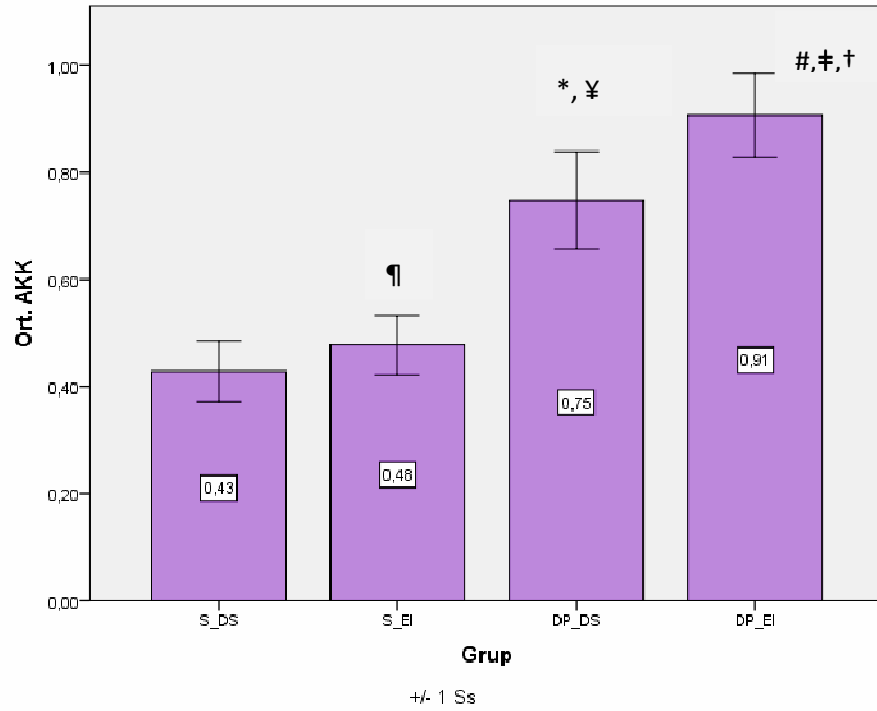
(AKK: Histolojik olarak hesaplanan alveolar kemik kaybı, S: Sağlıklı, DP: Deneyisel Periodontitis, DS: Distile su, EI: Enerji içeceği, Ort: Ortalama, Ss: Standart sapma, Min: Minimum, Max: Maksimum, $*=p < 0.05$: İstatistiksel olarak anlamlılık)

Alveolar kemik kaybı S_Eİ grubu S_DS grubundan istatistiksel olarak anlamlı daha fazla bulunmuştur ($p<0.05$). DP_DS, S_DS ve S_Eİ'den istatistiksel olarak anlamlı daha büyüktür ($p<0.05$). D_Eİ, S_DS ve S_Eİ'den istatistiksel olarak anlamlı daha büyüktür ($p<0.05$). DP_Eİ de DP_DS'den istatistiksel olarak anlamlı daha büyük bulunmuştur ($p<0.05$) (Grafik 4.14). Sonuçlara bakıldığında, DP grupları Sağlıklı gruplardan istatistiksel olarak anlamlı daha fazla kemik kaybı göstermektedir. Grupların kendi içinde de enerji içeceği gruplarında distile su gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı fazla kemik kaybı bulunmuştur.

Tablo 4.21. Gruplar arasında AKK değerlerinin karşılaştırılması

	Grup	N	Mean Rank	Sum of Ranks	P
AKK	S_DS	8	6.00	48.00	0.036*
	S_Eİ	8	11.00	88.00	
AKK	S_DS	8	4.50	36.00	0.001*
	DP_DS	8	12.50	100.00	
AKK	S_DS	8	4.50	36.00	0.001*
	DP_Eİ	7	12.00	84.00	
AKK	S_Eİ	8	4.50	36.00	0.001*
	DP_DS	8	12.50	100.00	
AKK	S_Eİ	8	4.50	36.00	0.001*
	DP_Eİ	7	12.00	84.00	
AKK	DP_DS	8	5.13	41.00	0,008*
	DP_Eİ	7	11.29	79.00	

(*= $p<0.05$, istatistiksel olarak anlamlılık)



Grafik 4.14. Ortalama AKK değerlerinin karşılaştırılması

¶: S_DS ve S_Eİ grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık

*: S_DS ve DP_DS grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılık

#: S_DS ve DP_Eİ grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılık

‡: S_Eİ ve DP_Eİ grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılık

¥: S_Eİ ve DP_DS grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılık

†: DP_DS ve DP_Eİ grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılık

4.3.2. İmmünohistokimyal veriler

4.3.2.1. RANKL

İmmünohistokimyasal olarak incelenen RANKL'ın gruplar arasındaki farklılığını değerlendirmek için parametrik bir test olan One-Way Anova testi kullanılmıştır (Tablo 4.22) ve anlamlı farklılık bulunmuştur ($p < 0.05$). Benforrini ve Tukey post-hoc testleri ile gruplar arasındaki anlamlılık test edilmiştir (Tablo 4.23).

Tablo 4.22. Grupların RANKL dağılımları

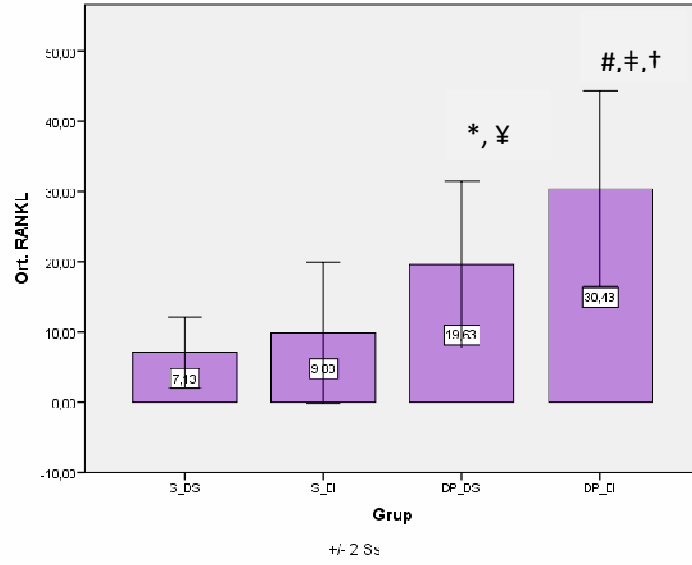
RANKL	Sağlıklı Distile Su	Sağlıklı Enerji İçeceği	Deneyisel Periodontitisli Distile Su	Deneyisel Periodontitisli Enerji İçeceği	p
Ort±Ss	7.13±2.53	9.88±5.03	19.63±5.93	30.43±6.95	0.000*
(Min-Max)	(4-12)	(4-17)	(9-29)	(24-40)	

(RANKL: Histolojik olarak hesaplanan Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand, -Reseptör Aktivatörü Nükleer faktör Kappa-B Ligand-, S: Sağlıklı, DP: Deneyisel Periodontitis, DS: Distile su, Eİ: Enerji içeceği, Ort:Ortalama, Ss: Standart sapma, Min: Minimum, Max: Maksimum, *= $p<0.05$: İstatistiksel olarak anlamlılık)

S_DS ve S_Eİ grupları arasında RANKL sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p<0.05$). DP'li gruplarda, sağlıklı gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı daha fazla RANKL sayısı bulunmuştur ($p<0.05$). DP_Eİ grubunda RANKL sayısı DP_DS grubuna göre de istatistiksel olarak anlamlı daha fazla bulunmuştur (Grafik 4.15) (Fotoğraf 4.1).

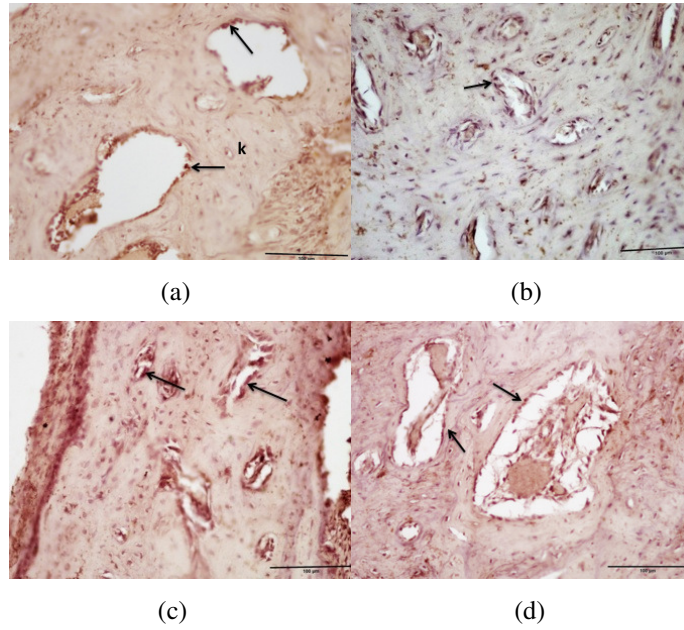
Tablo 4.23. Gruplar arasında RANKL değerlerinin karşılaştırılması

	(I) Grup	(J) Grup	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Tukey HSD	S_DS	S_EI	-2.75000	2.64809	.729
		DP_DS	-12.50000*	2.64809	.000
		DP_EI	-23.30357*	2.74104	.000
	S_EI	S_DS	2.75000	2.64809	.729
		DP_DS	-9.75000*	2.64809	.005
		DP_EI	-20.55357*	2.74104	.000
	DP_DS	S_DS	12.50000*	2.64809	.000
		S_EI	9.75000*	2.64809	.005
		DP_EI	-10.80357*	2.74104	.003
	DP_EI	S_DS	23.30357*	2.74104	.000
		S_EI	20.55357*	2.74104	.000
		DP_DS	10.80357*	2.74104	.003
Bonferroni	S_DS	S_EI	-2.75000	2.64809	1.000
		DP_DS	-12.50000*	2.64809	.000
		DP_EI	-23.30357*	2.74104	.000
	S_EI	S_DS	2.75000	2.64809	1.000
		DP_DS	-9.75000*	2.64809	.006
		DP_EI	-20.55357*	2.74104	.000
	DP_DS	S_DS	12.50000*	2.64809	.000
		S_EI	9.75000*	2.64809	.006
		DP_EI	-10.80357*	2.74104	.003
	DP_EI	S_DS	23.30357*	2.74104	.000
		S_EI	20.55357*	2.74104	.000
		DP_DS	10.80357*	2.74104	.003



Grafik 4.15. Ortalama RANKL değerlerinin karşılaştırılması

- *: S_DS ve DP_DS grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılık
- #: S_DS ve DP_EI grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılık
- ‡: S_EI ve DP_EI grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılık
- ¥: S_EI ve DP_DS grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılık
- †: DP_DS ve DP_EI grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılık



Fotoğraf 4.1. RANKL immün boyaması 40X büyütme

(a: S_DS, b: S_EI, c: DP_DS, d: DP_EI. Kemik doku (k), Osteoblastlar (→), Bar 100µm)

4.3.2.2. OPG

İmmünohistokimyasal olarak incelenen OPG'nin gruplar arasındaki farklılığını değerlendirmek için parametrik bir test olan One-Way Anova testi kullanılmıştır (Tablo 4.24) ve anlamlı farklılık bulunmuştur ($p<0.05$). Benforrini ve Tukey post-hoc testleri ile gruplar arasındaki anlamlılık test edilmiştir (Tablo 4.25).

Tablo 4.24. Grupların OPG dağılımları

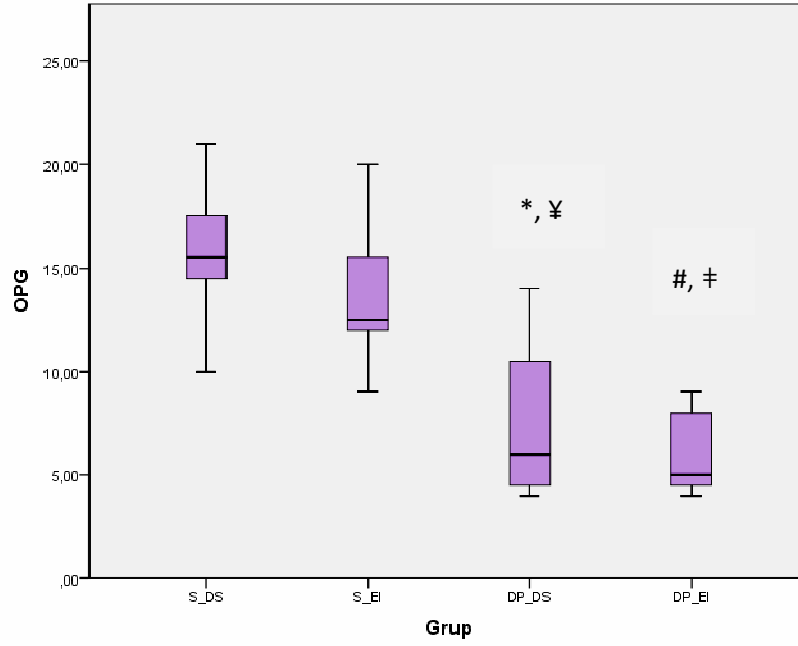
OPG	Sağlıklı Distile Su	Sağlıklı Enerji İçeceği	Deneyisel Periodontitisli Distile Su	Deneyisel Periodontitisli Enerji İçeceği	<i>p</i>
Ort±Ss	15.75±3.20	13.63±3.34	7.5±3.93	6.14±2.12	0.000*
(Min-Max)	(10-21)	(9-20)	(4-14)	(4-9)	

(OPG: Histolojik olarak hesaplanan Osteoprotegerin, S: Sağlıklı, DP: Deneyisel Periodontitis, DS: Distile su, EI: Enerji içeceği, Ort: Ortalama, Ss: Standart sapma, Min: Minimum, Max: Maksimum, $*=p<0.05$: İstatistiksel olarak anlamlılık)

S_DS-S_Eİ grupları ve DP_DS-DP_Eİ gruplarının kendi içlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmazken ($p>0.05$), P_DS ve DP_Eİ grupları, S_DS ve S_Eİ gruplarından istatistiksel olarak anlamlı daha az sayıda OPG'ye sahip bulunmuştur ($p<0.05$) (Grafik 4.16) (Fotoğraf 4.2).

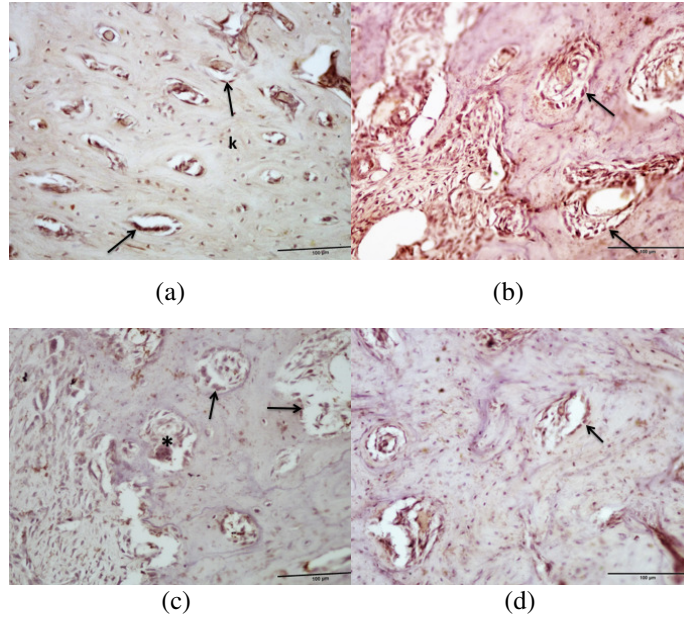
Tablo 4.25. Gruplar arasında OPG değerlerinin karşılaştırılması

	(I) Grup	(J) Grup	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Tukey HSD	S_DS	S_EI	2.12500	1.62228	.565
		DP_DS	8.25000*	1.62228	.000
		DP_EI	9.60714*	1.67922	.000
	S_EI	S_DS	-2.12500	1.62228	.565
		DP_DS	6.12500*	1.62228	.004
		DP_EI	7.48214*	1.67922	.001
	DP_DS	S_DS	-8.25000*	1.62228	.000
		S_EI	-6.12500*	1.62228	.004
		DP_EI	1.35714	1.67922	.850
	DP_EI	S_DS	-9.60714*	1.67922	.000
		S_EI	-7.48214*	1.67922	.001
		DP_DS	-1.35714	1.67922	.850
Bonferroni	S_DS	S_EI	2.12500	1.62228	1.000
		DP_DS	8.25000*	1.62228	.000
		DP_EI	9.60714*	1.67922	.000
	S_EI	S_DS	-2.12500	1.62228	1.000
		DP_DS	6.12500*	1.62228	.005
		DP_EI	7.48214*	1.67922	.001
	DP_DS	S_DS	-8.25000*	1.62228	.000
		S_EI	-6.12500*	1.62228	.005
		DP_EI	1.35714	1.67922	1.000
	DP_EI	S_DS	-9.60714*	1.67922	.000
		S_EI	-7.48214*	1.67922	.001
		DP_DS	-1.35714	1.67922	1.000



Grafik 4.16. Ortalama OPG değerlerinin karşılaştırılması

- *: S_DS ve DP_DS grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılık
- #: S_DS ve DP_Eİ grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılık
- ‡: S_Eİ ve DP_Eİ grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılık
- ¥: S_Eİ ve DP_DS grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılık



Fotoğraf 4.2. OPG immün boyaması 40X büyütme

(a: S_DS, b: S_Eİ, c: DP_DS, d: DP_Eİ. Kemik doku (k), Osteoblastlar (→), osteoklastlar (*), Bar 100µm)

4.3.2.3. RANKL/OPG

İmmünohistokimyasal olarak incelenen RANKL/OPG'nin gruplar arasındaki farklılığını değerlendirmek için parametrik bir test olan One-Way Anova testi kullanılmıştır (Tablo 4.26) ve anlamlı farklılık bulunmuştur ($p<0.05$). Benforrini ve Tukey post-hoc testleri ile gruplar arasındaki anlamlılık test edilmiştir (Tablo 4.27).

Tablo 4.26. Grupların RANKL/OPG dağılımları

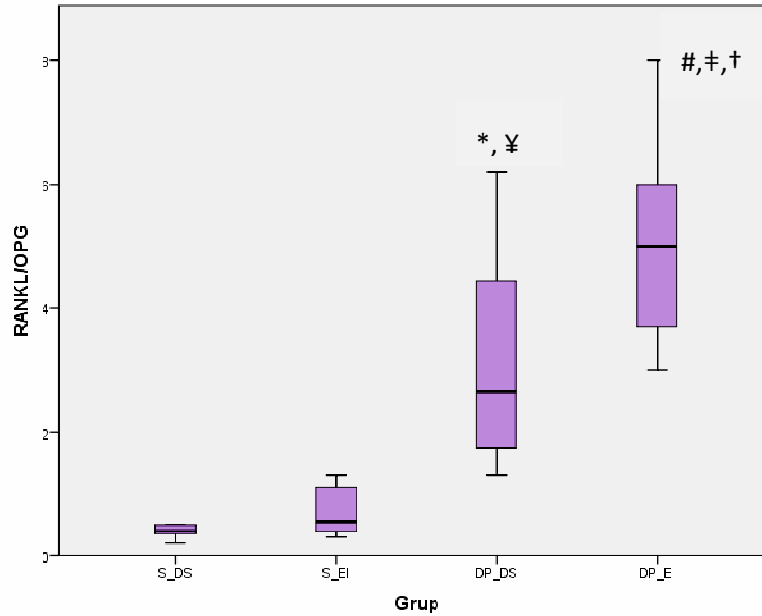
RANKL/OPG	Sağlıklı Distile Su	Sağlıklı Enerji İçeceği	Deneyisel Periodontitisli Distile Su	Deneyisel Periodontitisli Enerji İçeceği	<i>p</i>
Ort±Ss	0.40±0.11	0.71±0.41	3.15±1.74	5.06±1.76	0.000*
(Min-Max)	(0-1)	(0-1)	(1-6)	(3-8)	

(RANKL/OPG: Histolojik olarak hesaplanan Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand- Receptör Aktivatör Kappa B Ligand- ın Osteoprotegerine oranı, Ort:Ortalama, Ss: Standart sapma, Min: Minimum, Max: Maksimum, $*=p<0.05$: istatistiksel olarak anlamlılık)

Sağlıklı DS ve Sağlıklı Eİ arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p>0.05$). DP_DS ve DP_Eİ grupları, S_DS ve S_Eİ gruplarından istatistiksel olarak anlamlı daha fazla RANKL/OPG'ye sahip bulunmuştur ($p<0.05$). DP grupları kendi aralarında incelendiğinde ise DP_Eİ, DP_DS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı daha fazla RANKL/OPG'ye sahip bulunmuştur ($p<0.05$) (Grafik 4.17).

Tablo 4.27. Gruplar arasında RANKL/OPG değerlerinin karşılaştırılması

	(I) Grup	(J) Grup	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Tukey HSD	S_DS	S_EI	-.313	.617	.957
		DP_DS	-2.750*	.617	.001
		DP_EI	-4.657*	.638	.000
	S_EI	S_DS	.313	.617	.957
		DP_DS	-2.438*	.617	.003
		DP_EI	-4.345*	.638	.000
	DP_DS	S_DS	2.750*	.617	.001
		S_EI	2.438*	.617	.003
		D_EI	-1.907*	.638	.028
	DP_EI	S_DS	4.657*	.638	.000
		S_EI	4.345*	.638	.000
		DP_DS	1.907*	.638	.028
Bonferroni	S_DS	S_EI	-.313	.617	1.000
		DP_DS	-2.750*	.617	.001
		DP_EI	-4.657*	.638	.000
	S_EI	S_DS	.313	.617	1.000
		DP_DS	-2.438*	.617	.003
		DP_EI	-4.345*	.638	.000
	DP_DS	S_DS	2.750*	.617	.001
		S_EI	2.438*	.617	.003
		DP_EI	-1.907*	.638	.036
	DP_EI	S_DS	4.657*	.638	.000
		S_EI	4.345*	.638	.000
		DP_DS	1.907*	.638	.036



Grafik 4.17. Ortalama RANKL/OPG değerlerinin karşılaştırılması

*: S_DS ve DP_DS grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılık

#: S_DS ve DP_EI grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılık

‡: S_EI ve DP_EI grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılık

‡: S_EI ve DP_DS grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılık

†: DP_DS ve DP_EI grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılık

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada yaygın bir şekilde kullanılmakta olan enerji içeceğinin (RedBull®), deneysel periodontitis oluşturulmuş sıçanlarda alveolar kemik doku üzerindeki etkisi mikro bilgisayarlı tomografi ile ve histometrik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal olarak incelenmiştir. Çalışmamızın bulgularına göre enerji içeceğinin mikro bilgisayarlı tomografi bulguları ile kanıtlanamasa da histolojik bulgular ışığında alveolar kemik kaybını artırıcı etkilerinin olduğu bulunmuştur.

Araştırmamızda mikrobiyal dental biyofilm varlığı ve yokluğu durumunun bireylerde standardize edilememesi ve periodontitisin (yaş, sigara, stres, genetik vb.) etkilendiği çeşitli modifiye edici faktörlerin standardize edilebilmesi amacıyla deneysel periodontitis modeli tercih edilmiştir. Literatürde deneysel periodontitis modelleri için primatlar, tavşanlar, mini pigler (domuz), köpekler, kemirgenler (fareler ve sıçanlar) kullanıldığı görülmektedir. Kemirgen sınıfında olan sıçanların molar segmenti insan periodontal dokuları (oral epitel, sulkular epitel, birleşim epiteli, periodontal ligament, alveol kemiği, hücreli ve hücresiz sement) ile benzerlikler göstermektedir. Deneysel periodontitis modeli için en yaygın kullanılan türler sıçanlar ve farelerdir (209). Sıçanlar; küçük, ucuz ve kolay elde edilebilir olmaları nedeniyle deneysel çalışmalarda sıklıkla tercih edilen türlerdir. Bununla birlikte sıçanlarda oluşturulan deneysel periodontitisin insanlarda görülen periodontal hastalıklar ile klinik ve histolojik olarak benzer bulgular gösterdiği de belirlenmiştir (210). Avantajlarının yanında; doğal olarak periodontitise dirençli olması, insanlardan farklı mikrobiyal flora göstermesi, doku analizi için çok küçük boyutta olması ve çok sayıda hayvana ihtiyaç duyulması dezavantajları olarak gösterilmiştir. Bu bilgiler ışığında bu çalışmada deney hayvanı olarak erkek Albino Wistar sıçanlar (10-12 haftalık ve vücut ağırlıkları 200-300 g) kullanılmıştır.

Deneysel periodontitis modelleri ligatürle, gingival dokuya kimyasal madde (trinitrobenzen sülfonik asit, dekstran sülfat sodyum), mikroorganizmalar ya da mikroorganizmaların ürünleri inoküle edilerek oluşturulmaktadır (209). Farelerde

periodontopatojenlerle oluşturulan deneysel periodontitis, gavajla (intraoral inokülasyon) patojenlerin (tipik olarak 3 ya da daha fazla doz, 109 bakteri) tekrar tekrar uygulanmasıyla oluşturulur. Bu yolla enfeksiyonun ardından periodontitis oluşması için birkaç hafta beklenir (211). Periodontopatojenle ıslatılmış ligatür kullanıldığında ise periodontitis oluşma süreci 7-14 güne inmektedir (212). Periodontitis modellerinin hiç birinde hayvanın kendi oral florasıyla ve kendiliğinden oluşmuş bir periodontitis gösterilmemiştir. Farelerde oluşturulan chamber modelleri ise periodontal alanda lokalize olmaması ve sadece yumuşak doku enfeksiyonu görülmesi nedeniyle daha çok konak-bakteri etkileşimlerinin araştırılması için değerli görülmektedir (209).

Sıçanlarda deneysel periodontitis modelinin oluşturulmasında tekrarlanabilir ve bölgede travma oluşturmeyen bir teknik kullanılması gerektiği belirtilmiştir. Bu teknikler arasında en sık kullanılanları bölgeye endotoksin enjeksiyonu ve dişlerin ligatürlenmesidir (210, 213). Endotoksin enjeksiyonunun ligatür yerleştirme işlemine göre bölgede ek bir travma oluşturduğu bildirilmiştir (210). Çalışmamızda insan periodontal lezyonunda görülen enflamatuvar selüler infiltrat ve alveolar kemik kaybı gibi özellikleri taklit edebilmesi nedeniyle, ligatürle indüklenen deneysel periodontitis modeli tercih edilmiştir (37, 214, 215, 216, 217). Ligatürle indüklenen deneysel periodontitis modellerinde molar diş kolesinde gingival sulkus içerisine ligatür yerleştirilmesiyle biyofilm birikimi artırılır. Sonuç olarak birleşim epiteli bozulur, osteoklastogenezis artar ve kemik yıkımı oluşur (209). Ligatürle indüklenmiş periodontitis modellerinin limitasyonu dokudaki travma ve bakteri miktarındaki artışa bağlı olarak akut bir model olması ve insandaki kronik periodontal hastalığı tam anlamıyla temsil etmemesidir (218). Ligatür yerleştirilmesini takiben 3. günde yıkım şiddetlenir ve 7.-11. günlerde yıkım en üst seviyeye ulaşır. 14. günden sonra kemik yıkımında azalma gözlenir (219). Kuhr ve ark. (220)'ları, sıçanların molar dişlerine sütür bağlamışlar ve 1., 15., 30. ve 60. günlerde aldıkları kesitlerde morfometrik olarak alveolar kemik düzeyini ölçmüşlerdir. Çalışmanın sonucunda en fazla kemik kaybının ilk 15 günlük süreçte oluştuğunu, 30. ve 60. günlerdeki kaybın hafif bir artış ile devam ettiğini belirlemişlerdir. Bununla beraber sıçanlarda dişlerin oklüzal-bukkal-distal yönde hareketi ligatürün etkisinde zamanla azalmaya neden olabilir. Ligatürle oluşturulan

deneysel periodontitis modelinde bir süre sonra gözlenen yıkım şiddetindeki azalma bu durum ile açıklanabilir. Bundan dolayı ligatürle oluşturulan deneysel periodontitis modellerinde çalışma süresi ≤ 15 gün olmalıdır (220, 221). Aksi halde yıkım şiddeti önemli ölçüde azalabilmektedir (220). Çalışmamızda deneysel periodontal hastalığın maksillada spongioz kemiğin pörözitesi nedeniyle daha hızlı meydana gelmesi ve de uygulayıcı için görüş ve girişimin kolay olması nedeniyle üst molar dişler seçilmiştir (205). Çalışmamızın deneysel periodontitis oluşturma prosedürü, Bakır B ve ark. (222)'lerinin deneysel periodontitiste sistemik TH17 cevabı, IL-17 ve ROR γ t gingival salınımı ve alveolar kemik kaybı üzerine zerdeçalın etkilerini araştırdığı çalışma ile benzerdir. Bhattarai G ve ark. (223) ve Goes P ve ark. (224)'lerinin yaptığı çalışmalarda da üst 2. Molar dişler ligatürün bağlanması için seçilmişlerdir. Bu bilgiler ışığında periodontal hastalığın oluşum döneminde enerji içeceğinin etkinliğini değerlendirmek için bu çalışmada deneysel periodontitis gruplarına uygun teknik olarak 3.0 ipek sütur kullanılarak üst 2. molar dişlere 14 gün boyunca submarjinal olarak ligatür yerleştirilmesi tercih edilmiştir. Bu sürede ligatür yerleştirilen bütün gruplarda deneysel periodontitis başarıyla oluşturulmuştur.

Sıçanlarda molar dişler oklüzal yüzeylerdeki atrizyona bağlı olarak süreklirüpsiyona uğrar ve buna bağlı olarak alveolar kemikte remodeling gerçekleşir. Periodontal hastalığın olmadığı durumlarda bukkal yüzeylerde mine-sement sınırı ve alveolar kemik kreti arasındaki uzaklık aynı kalırken, palatinal ve lingual bölgelerde bu iki nokta arasındaki uzaklık yaşa bağlı olarak artar (225). Bu nedenle çalışmalarda aynı doğum aralığına sahip sıçanlar kullanılmalıdır. Bizim çalışmamızda da 10-12 haftalık erkek Albino Wistar sıçanlar kullanılmıştır.

Kemik, osteoklastlar ve osteoblastlar aracılığı ile sürekli olarak rezorpsiyon ve formasyonun devam ettiği dinamik bir dokudur ve bu süreç kemik remodelingi olarak bilinmektedir. Çok çeşitli endojenöz ve ekstrasjenöz faktörler kemik dokunun formasyonu, absorpsiyonu ve remodelingini kontrol etmekte ve olumlu veya olumsuz olarak etkilemektedir (8). Çeşitli laboratuvar ve klinik çalışmalar ile antioksidanlar, tıbbi bitki özütleri, aminoasitler ve vitaminler kullanılarak yumuşak doku ve sert doku kemik metabolizması üzerine yeni yaklaşımlar geliştirilmektedir. Yapılan literatür taramasında enerji içeceklerinin içinde bulundurduğu maddeler ile

metabolizma hızını arttırdığı, merkezi sinir sistemini uyardığı tespit edilmiştir (10, 12, 13, 147, 148).

Literatürde enerji içeceğine genellikle tıp alanında kardiyovasküler sisteme etkileri, serebrovasküler cevap, nörolojik etkiler, stres seviyeleri, anksiyete, depresyon, çalışma performansı, uyku-uyanıklık gibi konuları ele alan çalışmalarda rastlanmıştır (226, 227, 228, 229, 230). Enerji içeceğinin içeriğinde bulunan taurin ve B vitamininin osmoregülasyon, membran stabilizasyonu, serbest oksijen radikallerinin negatif etkilerinin eliminasyonu, antilipit peroksit, antiapoptotik ve hücre rejenerasyonu özellikleri ile ilgili olarak diş hekimliğinde kemik metabolizmasından ziyade yara iyileşmesi üzerinde olumlu etkiler gösterdiğini belirten bir çalışma bulunmaktadır. Tek M ve ark. (14)'lerinin yaptığı çalışmada, sıçanların sırtında paravertebral yumuşak doku yarası oluşturulmuş ve enerji içeceği (Red Bull® Türkiye) gavaj yoluyla verilmiştir. Kontrol grubuna ise aynı hacimde su verilmiştir. 3., 7. ve 14. günlerde toplanan örneklerde histomorfometrik (reepitelizasyon, granülasyon dokusunun matürasyonu, kollajen organizasyonu) ve immünohistokimyasal (VEGF, α -düz kastin aktin (α -SMA)) değerlendirme yapılmıştır. Çalışmanın sonucunda, enerji içeceği grubunda 3. ve 7. günlerde kollajen depozisyonunun kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha fazla olduğu gösterilmiştir. Yedinci gün örneklerinde reepitelizasyonun da enerji içeceği grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha fazla olduğu görülmüştür. İmmünohistokimyasal değerlendirme sonucu, yeni damar oluşumu simgesi olan VEGF'in 7. ve 14.günlerde enerji içeceği grubunda istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek olduğu görülmüştür. Granülasyon doku oluşumu için Tek M ve ark. (14)'ları gruplar arası farklılık bulamamışlardır. Literatürde ise enerji içeceğinin diş hekimliğinde kemik metabolizması üzerine olası etkilerini değerlendiren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Literatürdeki bu eksiklikten yola çıkarak, bu çalışma yaygın bir şekilde kullanılmakta olan enerji içeceğinin (RedBull®), deneysel periodontitis oluşturulmuş sıçanlarda alveolar kemik doku üzerindeki etkisini mikro bilgisayarlı tomografi ile ve histometrik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal olarak değerlendirmiştir.

Çalışmamızda Sağlıklı Distile Su (n=8), Sağlıklı Enerji İçeceği (n=8), Deneysel Periodontitisli Distile Su (n=8) ve Deneysel Periodontitisli Enerji İçeceği (n=7) grubu olmak üzere 4 grup yer almaktadır. Gruplara gavaj yolu ile aynı dozda 14 gün süre ile distile su ya da enerji içeceği uygulanmıştır. Doz ayarlaması ise erişkin bir insan (yaklaşık olarak 70 kg), günde 1 kutu (RedBull®, Türkiye) 250 ml enerji içeceği kullandığı varsayılarak yapılmıştır (14). Bu hesaplama da 1 sıçan için ortalama 3.57 ml/kg değere tekabül etmektedir.

Yapılan araştırmalara göre kemik yapım-yıkımının kontrolünde TNF ailesine bağlı bir dizi sitokin tanımlanmıştır (59, 61, 69, 231). Bu moleküller - RANKL, reseptörü RANK ve OPG- tanımlanmış osteotropik faktörlerin en son etkileyicileri gibi gözükmektedirler (69).

Normal fizyolojik koşullar altında kemik oluşumu ve yıkımı arasında bir denge bulunmaktadır. Belli patolojik durumlarda ise denge değişebilir; osteopetrosiste kemik oluşumu artarken, periodontitis ve osteoporoz durumlarında yıkımda artış gösterilebilir (232, 233). Kemik yapımının artışı RANKL/OPG oranının düşmesi olarak da açıklanan OPG seviyesinin yükselmesi veya RANKL seviyesinin azalması sonucu meydana gelmektedir. Tam tersine RANKL/OPG oranının yükselmesi olarak da bilinen OPG seviyesinin düşmesi veya RANKL seviyesinin yükselmesi durumunda patolojik kemik yıkımı oluşmaktadır (234).

Bizim çalışmamızda da, periodontal kemik rezorpsiyonu ve formasyonunu düzenleyen RANKL, OPG ve RANKL/OPG değerleri immünohistokimyasal olarak değerlendirilmiştir. İmmünohistokimyasal değerlendirmede S_DS grubu, DP_DS ($p=0,000$) ve DP_Eİ ($p=0,000$) gruplarından istatistiksel olarak anlamlı daha az RANKL değerine sahiptir. S_Eİ grubu ise, DP_DS ($p=0.006$) ve DP_Eİ ($p=0.000$) gruplarından istatistiksel olarak anlamlı daha az RANKL değerine sahiptir. S_Eİ ve S_DS grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Deneysel periodontitis oluşturulan gruplara bakıldığında ise enerji içeceği grubunda distile su grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı daha fazla RANKL değeri bulunmuştur ($p=0.003$). OPG değerlerine bakıldığında ise sağlıklı gruplarda periodontitisli gruplara göre daha yüksek OPG değerleri hesaplanmıştır. S_DS grubunda, DP_DS ($p=0.000$) ve DP_Eİ ($p=0.000$) gruplarına göre istatistiksel olarak

anlamli daha yüksek OPG değerleri bulunmuştur. S_Eİ grubunda ise DP_DS ($p=0.005$) ve DP_Eİ ($p=0.001$) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamli fazla OPG değerleri hesaplanmıştır. Periodontitisli grupların kendi arasında istatistiksel olarak anlamli bir farklılık bulunmazken; OPG değeri DP_DS grubunda, S_DS ($p=0.000$) ve S_Eİ ($p=0.000$) gruplarından istatistiksel olarak anlamli daha azdır. DP_Eİ grubunda da OPG değeri, S_DS ($p=0.000$) ve S_Eİ ($p=0.005$) gruplarından istatistiksel olarak anlamlilik daha az bulunmuştur. Tang H ve ark.'larının (235) yaptığı deneysel çalışmada lokal rekombinant OPG plasmid-aracılı gen tedavisi ile *in vivo* osteoklastogenezin baskılandığı ve sıçanlardaki deneysel periodontitis nedeniyle belirlenen kemik yksekliliğindeki azalmanın önlendiği belirtilerek OPG'nin önemi vurgulanmıştır. Çalışmamızda gruplar arasındaki RANKL/OPG değerleri karşılaştırıldığında ise, deneysel periodontitis gruplarında kontrol gruplarından daha yüksek değer bulunmuştur. S_DS ve S_Eİ grupları arasında istatistiksel olarak anlamli bir farklılık bulunmazken ($p=1.000$), DP_Eİ grubunda DP_DS grubuna göre istatistiksel olarak anlamli daha fazla bir değer ortaya çıkmıştır ($p=0,036$). Ayrıca S_DS grubu, DP_DS ($p=0.001$) ve DP_Eİ ($p=0.000$) grubundan istatistiksel olarak anlamli daha küçüktür. S_Eİ grubu da, DP_DS ($p=0.003$) ve DP_Eİ ($p=0.000$) grubundan istatistiksel olarak anlamli daha küçüktür. Bir çok çalışmada OPG/RANKL salınımı oranının kemik remodelinginin yönünü etkileyebileceği, OPG/RANKL oranındaki azalmanında metabolik kemik hastalığı için önemli bir parametre olduğu belirtilmektedir (113, 236, 237). Bazı alışmalarda OPG seviyelerinde değişiklik olmadan kronik periodontitisli bireyler sağlıklı bireyler ile karşılaştırıldığında, çözülebilen RANKL konsantrasyonunda artış olduğu gözlenmiştir (64, 238). Ancak, hastalıklı gingival dokularla karşılaştırıldığında sağlıklı kontrollerde RANKL protein salınımı artarken, OPG seviyeleri düşmektedir (239). Dağılımlar çalışmadan çalışmaya farklılık gösterse de RANKL/OPG oranının sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında periodontitisli bireylerde fazla oluşu genellikle aynıdır. (64, 234, 238, 239, 240, 241). Tüm bu bilgiler ışığında, RANKL salınımındaki artış ve OPG salınımındaki azalma ile kemik metabolizmasındaki dengenin bozulması sonucu deneysel periodontitis modelinin oluştuğu ve enerji içeceğinin kullanımı ile de kafein, sükroz içeriği ve biyofilmin sinerjik etkisinin periodontitisli grupta hastalığı daha da şiddetlendiği ve konak cevabını değiştirerek

konak cevabını yıkım yönünde arttırdığı düşünülmektedir. Konak cevabını nasıl değiştirdiği ve immün sisteme olan etkilerinin anlaşılabilmesi için daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Diş eti oluğu sıvısı (DOS) ve tükürük gibi ağız sıvılarındaki ve serum veya plazma gibi kan dolaşımındaki moleküller periodontal doku yıkımı için hassas ve spesifik bir markır elde etmek için araştırılmıştır (242). DOS ve tükürük, non-invaziv ve hastaya minimal rahatsızlık ile toplanabildiği ve hem lokal olarak senteztezlenebilen hem de sistemik olarak üretilen moleküllerden oluştuğu için tercih edilebilmektedir (242). Serum veya plazmadaki doku yıkımının moleküler belirteçlerini değerlendiren çalışmalarda, periodontal hastalık belirtilerinin periodontitis ve çeşitli durumlar arasındaki olası etkileşimler açıklanmaya çalışılmaktadır (242). RANKL ve OPG de gingival dokular, DOS, tükürük ve serumdan tespit edilebilmektedir. Böylece periodontal hastalığın aktivitesi hakkında gerçekçi bilgiler verilebilmektedir. Bizim çalışmamızda deney hayvanlarındaki ağız sıvılarının toplanma zorluğundan ve tespit için yeterli hacmin elde edilememe sorunlarından dolayı sakrifikasyon işlemi sonrası kardiyak kan alınarak santrifüj işleminden sonra serumdaki parametreler değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda biyokimyasal olarak incelenen serum RANKL ($p=0.675$), serum OPG ($p=0.734$) ve serum RANKL/OPG oranı ($p=0.144$) değerleri için gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır. Periodontal olarak hastalıklı alanlarda lokal olarak RANKL sayılarının arttığı ve OPG seviyelerinin düştüğü çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir (234, 240, 243). Ancak periodontal sağlık ve RANKL ve OPG'nin sistemik seviyeleri için çelişkili sonuçlar ortaya konulmuştur ve periodontal hastalık ve doku yıkımı ile ilişkili bu mediyatörlerin rolü hem sistemik hem de lokal seviyeler için belirsizliğini korumaktadır (244, 245). Bizim çalışmamıza benzer olarak Antonoglou ve ark. (246)'larının çalışmasında da serum RANKL sayısive RANKL/OPG oranında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamış ve periodontal enflamasyon ve doku yıkımı ile ilişkilendirilememiştir. OPG'nin periodontal doku yıkımının indikatörü olabileceği sonucuna varılmıştır (246). Bu sonuç Lappin ve ark. (244)'lerinin şiddetli periodontitisli diyabetik bireylerde kanda yüksek seviyede tespit ettiği serum OPG sonuçları ile uyumludur.

Çeşitli çalışmalarda lokal seviyelerde, OPG'nin periodontal sağlık ve daha az kemik kaybı ile ilişkili olduğu, RANKL konsantrasyonu ve RANKL/OPG oranının ise periodontal sağlıktan gingivitise yada periodontitise geçişte artma eğiliminde olduğu görülmektedir (126, 242). Periodontal hastalık ve doku yıkımı ile ilişkili olarak RANKL-RANK-OPG dizisinin lokal ve sistemik seviyelerde farklı rollerinin olduğu görülmektedir. OPG ve RANKL kaynaklarının karışık olması ve periodonsiyum, vasküler endotelial hücreler ve periferik kan lökositleri gibi lokal dokuları da içermesi ile lokal ve sistemik durumların kandaki RANKL ve OPG seviyelerinde farklılık yaratabileceği düşünülmektedir. Aynı şekilde çalışmamızda serum VEGF ($p=0.444$) ve serum FGF₂ ($p=0.634$) değerleri içinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır. Periodontal hastalığın patogeneğinde VEGF'in rolünü araştıran çalışmalarda çelişkili sonuçlar görülmektedir. Bazı çalışmalarda VEGF salınımı artarken (247, 248), bazılarında azalmakta (249) ya da etkilenmektedir (250). DOS VEGF seviyelerinin sağlıklıdan plağa bağlı gingivitise geçişte artış gösterdiği ve kronik periodontitisli bireylerin başlangıç periodontal tedavilerinden sonra DOS VEGF seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı azaldığı görülmüştür (251). Praadeep AR ve ark. (252)'lerinin yaptığı çalışmada DOS ve serum VEGF seviyelerinin hastalığın şiddeti ile ilişkili olarak arttığı ve periodontal hastalığın tedavisinden sonra azaldığı görülmüştür. İlave olarak DOS ve serum VEGF seviyeleri klinik periodontal parametreler ile pozitif olarak ilişkilendirilmiştir. Hastalığın şiddeti ile DOS VEGF artışı proenflamatuvar sitokinlerin veya periodontopatojenlerin uyarılması ile açıklanabilir. Booth ve ark. (247)'lerinin çalışmasında ise periodontal alanlarda sağlıklı alanlardan daha az DOS VEGF konsantrasyonuna rastlanmıştır. VEGF endotelial hücreler, plazma hücreleri, makrofajlar ve ilave olarak bağlantı, sulkular ve gingival epitelden salınabilmektedir. Çeşitli enflamatuvar mediyatörler (IL-6, IL-1 ve PGE₂), hipoksi, periodontal patojenler de VEGF salınımı arttırmaktadır (251). Periodontal dokulardan taşınan VEGF (hücreler ve proenflamatuvar sitokinler) yükselen serum VEGF konsantrasyonunun kaynağı olabilir. Daha uzun süre enerji içeceği uygulaması ile VEGF salınımının artabileceği ve böylece sonucu değiştirebileceği düşünülmektedir. FGF₂ ise periodontal rejenerasyonu destekleyen hücrelerin uyarılmasında fizyolojik olarak etkili bir büyüme faktörüdür. Periodontal ligament içindeki mezenşimal

hücreler üzerinde mitojenik etkilere ve anjiyojenik aktivitelere sahip olduğu düşünülmektedir (252). FGF₂'nin lokal uygulaması ile hem av köpeklerinde hem de non-human primat modellerde kontrol grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı periodontal rejenerasyon artışı gözlenmiştir (252). Histolojik olarak sharpey lifleri ile yeni sement, yeniden fonksiyon kazanan periodontal ligament fibrilleri ve yeni alveolar kemik oluşumu görülmüştür (254, 255). Sıçanlarda periodontitisin iyileşmesi üzerine psikolojik stresin etkilerini ve iyileşme sürecinde bFGF salınımının katkısını değerlendiren çalışmada enflamatuvar sitokinler ve bFGF arasında negatif korelasyon tespit edilmiştir (256). Deneysel periodontitisli sıçanlarda istatistiksel olarak anlamlı azalan bFGF salınımı gözlenmiştir. Psikolojik stresin sıçanlarda periodontitisin iyileşmesini geciktirdiği bunu da periodontal ligamentte bFGF salınımının azalması aracılığı ile yapabileceği sonucunu ortaya atmaktadır (256). Kronik periodontitisli lezyonlar ile ilişkili dokularda bFGF seviyelerinin azalabileceği bunun da periodontitis sırasında periodontal ligament hücreleri ve endotelyal hücrelerin hasarı nedeniyle bFGF salınımının azalması ile ilişkili olabileceği rapor edilmiştir (257). Serum düzeyinde bFGF seviyesini değerlendiren bir çalışmaya rastlanmamıştır. ELİSA kitlerinin duyarlılıklarının farklılığı ve enerji içeceğinin içerisindeki kompleks yapılanmanın sistemik sağlıkta farklı etkileşimler oluşturabilmesi ortaya çıkan farklılıkların sebebi olabilir. Çalışmamızda 14 günlük bir protokolle periodontitis oluşturulmuştur, ancak literatürde 7 gün-13 hafta arasında değişen farklı protokoller bulunmaktadır. Örnek olarak protokol süreleri; sıçanlarda ligatür ile indüklenen periodontitisin tedavisinde diode lazer etkinliğini değerlendiren çalışmada 1 hafta (258), Özdemir ve ark. (259)'larının sıçan periodontitis modelinde periodontitisin başlangıcı ve ilerlemesini önlemede thymoquinone etkinliğini değerlendiren çalışmasında 11 gün, Xu ve ark. (260)'larının overektomi sonrası sıçan deneysel periodontitis modelinde simvastatin uygulamasının alveolar kemik kaybı üzerine etkisini değerlendiren çalışmada 4 hafta, Toker H ve ark. (261)'lerinin deneysel periodontitisli diabetik ratlarda sistemik N-acetylcysteine (NAC) uygulamasına karşı gelişen morfometrik ve histopatolojik değişimleri değerlendiren çalışmasında ise 30 gün olarak belirlenmiştir. Kronik periodontitiste uzun bir zaman dilimi boyunca periodontopatojenlere maruz kalma sonucunda sistemik enflamatuvar yük oluştuğu düşünülürse 14 günlük protokolden

daha uzun süreli bir protokol uygulamasıyla daha farklı bir sistemik tablo karşımıza çıkabilir.

Çalışmamızda alveolar kemik kaybı miktarını ölçmek için mikro bilgisayarlı tomografi yardımıyla ve ayrıca histometrik olarak da mine-sement sınırı ile alveolar kret tepesi arasındaki mesafenin ölçümü tercih edilmiştir. Deneysel olarak oluşturulan alveolar kemik kaybı iki yöntemle belirlenebilmektedir. Birincisi mine-sement sınırı ile alveolar kret tepesi arasındaki mesafenin ölçümü, ikincisi açığa çıkan kök yüzeylerinden hesaplanan alan ölçümüdür. Alan ölçümü mesafe ölçümüne oranla kemik kaybını daha erken dönemlerde belirleyebilir ancak 15. günde her iki yöntem de kemik kaybı açısından doğru sonuçlar vermektedir. Daha ileri günlerde sıçanlarda ligatür ile oluşturulan periodontal kaybı belirlemede alan ölçümü yetersiz kalırken mesafe ölçümü daha güvenilir sonuçlar verebilmektedir (220). Bu nedenle mine sement sınırı ile alveolar kret tepesi arasındaki mesafenin ölçümünün daha güvenilir bir yöntem olduğu söylenebilir (221, 225).

Çalışmamızda histolojik olarak hesaplanan alveolar kemik kaybı S_Eİ grubunda S_DS grubundan istatistiksel olarak anlamlı daha fazla bulunmuştur ($p=0.036$). DP_DS grubunda, S_DS ($p=0.001$) ve S_Eİ gruplarından ($p=0.001$) istatistiksel olarak anlamlı daha fazla bulunmuştur. DP_Eİ grubundaki kemik kaybı da, S_DS ($p=0.001$) ve S_Eİ gruplarından ($p=0.001$) istatistiksel olarak anlamlı daha fazladır. DP_Eİ grubu da DP_DS grubundan istatistiksel olarak anlamlı daha fazla bulunmuştur ($p=0.008$). Sonuçlara bakıldığında, DP grupları Sağlıklı gruplardan istatistiksel olarak anlamlı daha fazla kemik kaybı göstermektedir. Grupların kendi içinde de enerji içeceği gruplarında distile su gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı fazla kemik kaybı bulunmuştur. Bu sonuçlar grupların immünohistokimyasal olarak hesaplanan RANKL seviyeleri ve RANKL/OPG oranı ile uyumludur. RANKL ve RANKL/OPG seviyelerinin en fazla olduğu DP_Eİ grubunda histolojik olarak yıkım en fazla bulunmuştur. Deneysel periodontitis gruplarındaki bu anlamlı farklılıkta RANKL/RANK/OPG mekanizmasının osteoklastogenezde etkili olabileceği düşünülmektedir. Sağlıklı gruplar arasında yıkımın istatistiksel olarak anlamlı daha fazla bulunduğu enerji içeceği grubu için ise farklı bir yıkım mekanizması üzerinden alveolar kemik kaybını arttırdığı düşünülmektedir. Ligatürün

oluşturduğu mekanik travma ve plak birikimindeki artışın periodontal dokuda enflamasyon meydana getirdiği ve bu enflamasyonun osteoklast aktivitesindeki artış sonucu alveolar kemik rezorpsiyonuyla sonuçlandığını gösteren çok sayıda hayvan çalışması bulunmaktadır (205, 261, 262). Deneysel periodontitis grubundaki alveolar kemik kayıpları da bu çalışmaların bulgularıyla paralellik göstermektedir.

Histoloji kemiğin yapısını değerlendirmek için altın standard olarak görülmektedir. Ancak, invaziv ve iki boyutlu doğası ve histolojik artefaktlardan kaynaklanan zorluklar sayısal ölçümlerin doğruluğunu kısıtlamaktadır (263). Kemiğin yapısı, durumu ve yeniden şekillenmesi sıklıkla radyograflar ile takip edilmektedir. Bu metot düşük maliyetine ve kolay ulaşılabilirliğine rağmen fiziksel özelliklerine bağlı limitasyonlardan ve birçok değişkene sahip olmasından dolayı yeni tekniklerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmuştur. Kemik durumunun radyolojik değerlendirilmesi amacıyla üç boyutlu görüntüsü ile kemiğin kalite, kantite ve hacmi hakkında detaylı bilgi veren mikro bilgisayarlı tomografi (Mikro BT) bu tekniklerden biridir (264). Mikro bilgisayarlı tomografi, bilgisayarlı aksiyel tomografinin mikrometre boyutunda rezolüsyona sahip minyatürize edilmiş halidir. Mikron seviyesindeki 3 boyutlu mineral yapıyı bozmadan görüntüleyen bir tekniktir. Biyomedikal alanda özellikle sert dokuların görüntülenmesinde yarar sağlamaktadır. Mikro BT kemiğin geometrisi, mineral yoğunluğu ve pörözitesi ve trabeküler yapının profili hakkında bilgi sağlayabilmektedir (265).

Bizim çalışmamızda da radyografik teknikler arasında güncel olduğu ve avantajları göz önünde bulundurularak Mikro BT tercih edilmiştir. Mikro bilgisayarlı tomografi değerlerinden TV gruplar arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır ($p=0.094$). Bu durum ilgili alanların doğru seçildiğini göstermektedir. BV değerleri karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p=0.003$). S_DS ve S_Eİ grupları arasında kemik hacminde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p=0.208$). S_DS grubunda ise kemik hacmi DP_DS ($p=0.016$) ve DP_Eİ ($p=0.002$) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur. DP_Eİ ise DP_DS'ye göre istatistiksel olarak anlamlı küçük olmaya eğilimlidir ($p=0.064$). Bu durum da hastalık modeli oluşturularak kemik hacminin deneysel periodontitis

gruplarında azaltıldığı anlamına gelmektedir. Deneysel periodontitis grupları arasındaki farklılığın Mikro BT’de incelenen kesit sayıları arttırıldığında enerji içeceği lehine anlamlı çıkacağı düşünülmektedir. PBV değerleri de gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.000$). S_DS ve S_Eİ grupları arasında kemik hacim yoğunluğunda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p=0.753$). S_DS grubunda ise PBV DP_DS ($p=0.006$) ve DP_Eİ ($p=0.002$) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur. S_Eİ gruplarında da PBV DP_DS ($p=0.006$) ve DP_Eİ ($p=0.003$) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı daha yüksektir. DP_Eİ ve DP_DS grupları arasında ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır. PBV kemik rezistansının en önemli ölçümüdür (266). Tb.Th değerlerine bakıldığında ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p=0.408$). Tb.N değerleri açısından ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p=0.028$). S_DS ve S_Eİ grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır ($p=0.674$). S_DS, DP_DS ($p=0.021$) ve DP_Eİ’den ($p=0.037$) istatistiksel olarak anlamlı daha fazladır. S_Eİ, DP_DS’den istatistiksel olarak anlamlı daha fazladır ($p=0.046$). S_Eİ, DP_Eİ grubundan istatistiksel olarak anlamlı fazla olmaya eğilimlidir ($p=0.064$). İncelenen Mikro BT kesit sayısı arttırıldığında sonucun anlamlı çıkacağı düşünülmektedir. DP grupları arasında ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktur ($p=0.355$). Hastalık oluşturulan DP modellerinde trabekül sayısının azalması beklenen bir sonuçtur. Tb.Sp değerlerine bakıldığında gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p=0.001$). S_DS ve S_Eİ grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p=0.074$). S_DS grubu DP_DS grubundan istatistiksel olarak anlamlı daha azdır ($p=0.005$). S_Eİ grubu da DP_DS ($p=0.001$) ve DP_Eİ ($p=0.005$) gruplarından istatistiksel olarak anlamlı daha azdır. DP_DS ve DP_Eİ grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır ($p=0.298$). Hastalık oluşturulan gruplarda trabekül separasyonu artmıştır. Bu da hastalık modelleri oluşturulan gruplar için beklenen bir sonuçtur. BMD açısından değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p=0.000$). Sağlıklı ($p=1.000$) ve DP’li grupların ($p=1.000$) kendi aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır. DP_DS grubu S_DS grubundan istatistiksel olarak anlamlı daha az ($p=0.005$) ve S_Eİ ($p=0.094$) grubundan ise az bulunmuştur. DP_Eİ

grubu da S_DS ($p=0.000$) ve S_Eİ ($p=0.009$) grubundan istatistiksel olarak anlamlı daha az bulunmuştur. DP'li gruplar ise sağlıklı gruplardan istatistiksel olarak anlamlı daha az bulunmuştur. Enerji içeceği gruplarında kemik mineral yoğunluğu azdır ama bu istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. KKO değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p=0.000$). S_DS-S_Eİ ($p=1.000$) ve DP_DS-DP_Eİ ($p=1.000$) gruplarının kendi içlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamazken, DP grupları sağlıklı gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı daha yüksek bulunmuştur ($p=0.000$). DP gruplarındaki alveolar kemik kaybı deneysel hastalık modelinin oluşturulduğunu doğrulamaktadır. Ancak radyolojik olarak enerji içeceği gruplarında KKO yüksek bulursa da gruplar arasında bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. Doğru sonuçlara ulaşabilmek adına, kemiğin mikro yapısının değerlendirilebilmesi için klasik olarak histolojik kesitlerin kullanılması gerekmektedir (267). Farklı doku tiplerinin görüntülenebilmesi ve hücresel düzeyde görünüm sağlanması açısından (268) altın standart olarak kabul edilen histolojik inceleme de ise enerji içeceğinin alveolar kemik yıkımını arttırıcı etki gösterdiği bulunmuştur.

Mikro BT analizi sert dokunun doğru şekilde görüntülenmesi ve 3D yapısının değerlendirilmesi için kullanılmaktadır (269). Periodontal hastalık sırasındaki kemik değişimleri hakkında detaylı bilgi sağlayabilmektedir (270,271). Bizim çalışmamıza benzer olarak deneysel periodontitis oluşturulan gruplarda alveolar kemik yüksekliğinin azaldığını (KKO) ve trabeküler kemiğin mikromimari yapısını ifade eden parametrelerde (Tb.N, Tb.Th, Tb.Sp, BMD, BVF) bozunmalar olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Bae SH ve ark. (272)'ları mikro bilgisayarlı tomografik inceleme yöntemi kullanarak deneysel periodontitis oluşturulan sıçanlarda kemiğin internal mikro yapısı ve alveolar kemik kaybı üzerine daidzein etkisini değerlendirmiştir. İki hafta süre ile 4.0 ipek ligatür alt 1.molar dişlere uygulanmıştır ve Mikro BT ile kesitler incelenmiştir. Ligatürlü grupta alveolar kemik yüksekliğinin lineer olarak azaldığı; BVF, Tb.Th, BMD değerlerinin düştüğü ve Tb.SP değerinin ise yükseldiği gözlenmiştir. Sıçanlarda ligatür ve nikotin ile indüklenen deneysel periodontitiste Mikro BT yöntemi kullanılarak alveolar kemik kaybını değerlendiren çalışmada ligatür ile indüklenen alanlarda BMD, BVF, Tb.N, Tb.Th değerleri ligatürlenmeyen alanlara göre anlamlı daha azken; alveolar

kemik kaybı yüksekliği ve Tb.SP değerleri istatistiksel olarak anlamlı daha fazla bulunmuştur (273). Süt temel proteinin sıçanlarda oluşturulan deneysel periodontitis modelinde alveolar kemik yapımı üzerine etkisini değerlendiren çalışmada değişen zaman dilimlerinde ligatürlü gruplarda alveolar kemik kaybı yüksekliğinin arttığı gözlenmiştir (274).

Kafein, 1,3,7-trimethylxanthine, kahve, çay, çeşitli içecekler ve bazı reçetesiz satılan ilaçlarda bulunan yaygın tüketilen bir psiko-stimulandır. Enerji içeceklerinin temel bileşenidir ve içeriğinde yüksek oranda bulunmaktadır (150 mg/L). Kemik üzerindeki gerçek etkileri hala karmaşık olsa da (275), bazı çalışmalarda kronik kafein alımının azalan kemik mineral yoğunluğu (276), artan kemik fraktür riski (276) ve Ca^{+2} emiliminde azalma (277, 278) gibi kemik dokusu üzerindeki zararlı etkileri indükleyebileceği öne sürülmektedir. Tassinari MS ve ark. (157)'ları *in vitro* olarak kafeinin osteoblast diferansiyasyonu sırasında ekstraselüler matriks sentezini engellediğini göstermiştir. Bezerra JP ve ark. (279)'larının yaptığı çalışmanın sonuçlarında kafein alımının ligatür varlığında artan kemik kaybı ve RANKL/OPG hücrelerin oranı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda da hem sağlıklı hem de periodontal hastalıklı gruplar için enerji içeceğinin uygulandığı gruplarda distile su uygulanan gruplara göre histolojik olarak hesaplanan alveolar kemik kaybı istatistiksel olarak anlamlı fazla ve immünohistokimyasal olarak hesaplanan RANKL ve RANKL/OPG seviyeleri de periodontal hastalığın oluşturulduğu gruplar karşılaştırıldığında enerji içeceğinin uygulandığı grupta daha fazla bulunmuştur. Kafeinin enflamatuvar mediyatörlerin uyarılması ile indirekt olarak kemik rezorpsiyonunu etkilediği görülmektedir (152, 280). Önceki çalışmalarda kafeinin siklooksijenaz/prostaglandin E_2 -ilişkili RANKL-aracılı osteoklastogenezi arttırdığı ve osteoblast-benzeri hücreler üzerine prostaglandin E_2 nin inhibitör etkilerini uyarabileceği belirtilmektedir (152, 280). Çalışmamızda periodontal enfeksiyon altında (Örn. ligatür valığında), kafein ve biyofilmin kombine etkilerinin sonucu olarak enflamatuvar mediyatörlerin uyarılması ile kemik kaybının daha da belirginleştiği tahmin edilmektedir. Bu nedenle deneysel periodontitisin oluşturulduğu enerji içeceği grubunda RANKL sayısının diğer gruplara göre daha fazla arttığı ve RANKL/OPG oranını arttırdığı düşünülmektedir. Çeşitli mekanizmalar kemik hücreleri üzerine kafeinin zararlı etkilerini açıklamak için öne

sürülmüştür. Zhou Y ve ark. (281)'ları kafeinin kemik iliği kaynaklı mezenşimal stromal hücrelerin osteojenik gelişim ile bağlantısı üzerinde doza bağımlı olumsuz etki ettiğini belirtmektedirler. Aynı zamanda kafein intraselüler siklik adenosin monofosfat konsantrasyonu ve glukokortikoid reseptör aktivitesini arttırarak, vitamin D reseptör salınımını azaltarak ve mitokondri-bağımlı hücre ölüm sinyalizasyonunu aktive ederek proliferasyon, kemik oluşturma gücü ve osteoblastların varlığını sürdürebilmesi üzerine inhibitör etkileri arttırmaktadır (152, 154, 156, 280, 282, 283). Liu SH ve arkadaşları düşük konsantrasyonlarda bile kafeinin osteoklastogenez ve kemik rezorpsiyon aktivitesini anlamlı derecede arttırdığını göstermişlerdir (280). Sakamoto ve ark. (284)'ları sıçanlarda LPS enjeksiyonu sonrası TNF- α ve IL-6 üretimi üzerine kahve alımının etkilerini değerlendirmişlerdir. Ancak serum sitokin seviyeleri LPS enjeksiyonu sonrasında belirgin bir şekilde artarken, hem enjeksiyon uygulanan hem de uygulanmayan gruplarda kahve tüketiminin TNF- α ve IL-6 üretimi üzerine etkisinin olmadığı görülmüştür. Bunun nedeni olarak da düşük doz kafein varlığı ve ligatür uygulaması yerine LPS enjeksiyonun seçilmesi olarak düşünülmektedir. Kamagata-Kiyouura ve ark. (152)'ları düşük ya da yüksek konsantrasyonlardaki kafein ve PGE₂ ilişkisinin *in vitro* osteoblast benzeri hücrelerin proliferasyonunu etkili bir şekilde inhibe ettiğini belirtmekte ve periodontitisli hastaların patolojik durumlarının ilerlemesinde kronik kafein alımının olası bir risk faktörü olabileceğini öne sürmektedir. Kafein osteoblast benzeri hücre hattında vitamin D reseptör salınımını azalttığı için, kemik kaybının moleküler mekanizmalarına engel olan potansiyel ajan olabilir (154). Sıçanlarda, yüksek doz kafein tüketimi serum osteokalsin seviyelerinde artan kemik turnover ve kemik mineral yapısının azalması ile ilişkilendirilmiştir (275, 285). Yüksek doz kafeinin intraselüler oksidatif stresi uyarak osteoblastlarda hücrenin varlığını sürdürebilmesini azalttığı gösterilmiştir (282). Duarte PM ve arkadaşlarının çalışmasında (286), günlük yüksek doz kafein alımının kemik iyileşmesinin erken aşamalarını bozabileceği ama 56 günlük uygulama sonrası kemik yoğunluğunu değiştirmeyeceği gösterilmiştir. Başka bir çalışmada düşük doz kafeinin osteoblastik hücre hattında OPG salınımını azaltarak ve RANKL salınımı arttırarak osteoklast diferansiyasyonunu düzenlediği belirtilmiştir (280). Kafeinin direkt olarak p38 MAP kinaz aktivasyonu ile osteoklast diferansiyasyonu ve maturasyonunu arttırdığı da

iddia edilmektedir (287). Lacerda SA ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (288), sıçanlarda kronik kahve/kafein alımının Ca^{+2} metabolizması üzerine ciddi yan etkilerinin olduğu belirtilmiştir, Bu çalışmada plazma ve idrarda artan Ca^{+2} seviyeleri, kemik mineral yoğunluğunda azalma ve düşük kemik hacmi ile kemik tamir sürecinde gecikme gözlenmiştir. Kafeinin yara iyileşmesi üzerine etkinliği değerlendirildiğinde adenoazin reseptör antagonisti olması dolayısıyla doza bağımlı olarak hücre proliferasyonunu baskıladığı, hücre migrasyonunda gecikmeye neden olduğu ve topikal olarak uygulandığında epitelizasyonu inhibe ettiği böylece de yara iyileşmesini geciktirdiği gösterilmiştir (289). Tüm bu bilgiler ışığında bizim çalışmamızdaki histolojik olarak değerlendirilerek hesaplanan alveolar kemik kaybı ve kemik kaybı parametreleri için anlamlı farklılık gösteren enerji içeceği gruplarında bu farklılığı yaratan etken maddelerden birinin de kafein olabileceği düşünülmektedir.

Enerji içeceklerinin bileşeninde bulunan Taurinin (200mg/250 ml) kemik üzerindeki etkilerini değerlendiren çalışmalardan birinde periodontal hastalıkta enflamatuvar kemik rezorpsiyonunun önlenmesi için taurinli ajan kullanımı ile osteoklast formasyonu ve kemik rezorpsiyonun önlenmesi ifade edilmiştir (166). Moon PD ve arkadaşlarının çalışmasında (290), kemik büyümesi üzerine istiridyede en çok bulunan amioasit olan taurinin etkisi araştırılmıştır. Yapılan deneysel çalışma sonucunda, taurinin IGF-1 seviyesini yükseltmesi ve JAK2-STAT5 fosforilasyonlarının uyarılması ile büyüme plakalarının kalınlığını arttırabildiği gösterilmiştir. Anlamlı miktarda Taurin kemik dokuya taşınmaktadır, bu nedenle kemik metabolizmasında önemli rol oynamaktadır. Ayrıca taurinin deneysel kemik rezorpsiyonunu ve osteoklast formasyon ve survivalını engellediği bulunmuştur (167). Bu aminoasidin alkalen fosfataz (alkaline phosphatase, ALP) aktivitesi ve kollajen sentezi üzerine uyarıcı etkileri bulunmaktadır (168). Aynı zamanda düşük Ca^{+2} diyeti ile indüklenen osteopenili sıçanlarda anti-osteopenik etkilerinin olduğu, böylece mineralizasyonu uyardığı ve kemik anabolik aktivitesine neden olduğu da gösterilmiştir (169). Taurin çeşitli organik bileşenlerle de birlikte kullanılmış ve etkileri araştırılmıştır. Tian X ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (291), bakır ve taurinin birlikte kullanımının yara iyileşmesinin her fazında etkili olduğu ve hem yaranın enfeksiyon riskini azalttığı hem de daha önemli olarak direkt olarak yara

iyileşmesini uyardığı belirtilmiştir. Degim ve arkadaşlarının çalışmasında (163), lokal olarak uygulanan taurin-kitosan jel formunun malondialdehit seviyesini azaltıp ve hidroksiprolin seviyesini arttırarak anlamlı derecede yara gerilim gücünü arttırdığı, hızlı kollajen üretiminde etkili olduğu ve re-epitelizasyonu geliştirdiği belirtilmiştir. Ozmeric ve arkadaşlarının yaptığı deneysel çalışmada (292), yara iyileşmesinin erken aşamalarında taurinin, kitosanın hızlandırıcı etkisini arttırabileceği bulunmuştur. Bu etkinin de özellikle periodontitis gibi yıkıcı hastalıklarda doku tamirinde yararlı olabileceği düşünülmektedir. Yapılan bir deneysel çalışmada, düşük B12 seviyelerinin osteoblast sayısını azalttığı ama osteoklast seviyesinin değişmeden kaldığı belirtilmiştir (183). Çalışmada B12-eksik anneden doğan farelerin, karaciğer hücrelerinin taurin üretmediği bulunmuştur. Fareler düzenli dozda taurin ile beslendiğinde kemiklerinin normal olarak büyüdüğü ve yoğunluğa ulaştığı görülmüştür (183). Choi MJ ve Seo JN'nin çalışmasında (293) sıçanlarda kemik mineral yoğunluğu ve kemik mineral içeriği üzerine taurin ile desteklenen diyetin etkileri araştırılmıştır. Çalışmadaki kontrol ve taurinli gruplar arasında serum ALP, osteokalsin ve PTH üzerine diyetin etkisi anlamlı bulunamamıştır. Ayrıca ALP, osteokalsin ve PTH konsantrasyonunda da anlamlı farklılık yoktur. Üriner Ca^{+2} atılımı taurinli grupta daha az ve femur kemik mineral içeriği/ağırlığı taurinli grupta anlamlı daha yüksek bulunmuştur. Bizim çalışmamızda taurinin olası olumlu etkilerinin kemik metabolizmasında kafeinin yüksek içeriği nedeni ile baskılandığı düşünülmektedir.

Enerji içeceği içerisinde bulunan ve alveolar kemik doku üzerinde olumsuz etkiler oluşturduğu düşünülen bir başka madde de glukozdur. Yüksek yağlı şekerli diyeti ile beslenmenin kemik metabolizması ve morfolojisi üzerine anlamlı yan etkilerinin olduğu ve bu etkilerin obezitenin enflamatuvar aşaması ile ilişkili artan osteoklast aktivitesi nedeniyle olduğu öne sürülmektedir (294). Obezite temel bir sağlık problemidir ve diyabet, osteoartrit ve periodontitis gibi kronik enflamatuvar hastalıklarla ilişkilendirilmektedir. Obeziteli bireylerde adipoz dokudan salgılanan ve hem obezitenin hem de periodontitisin patofizyolojisinde rol oynayan IL-6 ve TNF- α yüksek seviyelerde bulunmaktadır. Hatta bu sitokinlerin serum düzeyleri kilo kaybı ile azalmaktadır (295). Obezitenin periodonsiyum üzerindeki olumsuz etkileri; bozulan glukoz toleransı, dislipidemi, TNF- α , IL-6 gibi enflamatuvar sitokinler ve

adiponektin veya leptin gibi adipokinlerin aracılığı ile meydana gelebilmektedir (296, 297, 298, 299, 300, 301). Carvalho AAF ve ark. (302)'lerinin çalışmasında 8 haftalık sıçanlarda oluşturulan obezite modelinde yüksek şeker tüketiminin kemik yapısı, sertliği ve biyomekanik özellikleri üzerine etkileri incelenmiştir. Çalışma protokolü 56 gün ve yüksek şeker oranı da distile su da %30 olarak belirlenmiştir. Çalışmada yüksek şeker ile indüklenen obezitenin genç sıçanlarda artan vücut kitlesi, artan kan şekeri seviyesi, bağlı trabeküler kemik miktarında azalma, azalan kemik hacmi, artan trabeküler seperasyon ile düşük trabekül sayısı ile ilişkili bulgular ortaya koyarak distal femurundaki kansellöz kemiğin yapısına zararlı etkilerinin olduğu bulunmuştur. Aşırı şeker tüketimine bağlı artan vücut kütlesi osteoporöz veya osteoporotik kırıklara karşı korunamamaktadır. Kortikal ve kansellöz kemiğin mekanik özellikleri yüksek şeker ve yağ içerikli diyetten olumsuz etkilenmektedir (303, 304). Sıçanlarda yapılan çalışmalarda primer dentinogenezis sırasında yüksek şeker diyetin dentin formasyonunu ve dentin mineralizasyonunu azalttığı gösterilmiştir (305, 306). Dentin ve kemik formasyonu önemli benzerliklere sahiptir, bu nedenle osteoblastlar yüksek şeker diyetinden etkilenebilmektedir. Yapılan bir deneysel çalışmada yüksek şeker diyeti olan grupta her iki cinsiyette tibia ve femur için kemiğin kırılma direncinin anlamlı daha az olduğu bulunmuştur (303). Bizim çalışmamızda hiperglisemiye kanıtlayan ölçümler yapılmamıştır ancak yapılan çalışmalardaki glukozun olumsuz etkileri göz önüne alındığında enerji içeceğindeki glukozun alveolar kemik yıkımında etkisinin olabileceği düşünülmektedir.

Enerji içeceklerinin bileşeninde bulunan bir diğer önemli besin kaynağı ise B vitamini kompleksidir. Bizim kullandığımız enerji içeceği içerisinde niasinamid (vitamin B3), pantotenik asit (vitamin B5), B6 ve B12 vitaminleri bulunmaktadır. Japon bayanlar arasında uygulanan cross-sectional çalışmada premenopozal bayanlarda diyetle günlük B3 alımı ve kemik mineral yoğunluğu arasında anlamlı pozitif korelasyon bulunmuştur (307). B6'dan yoksun beslenen tavuklarda azalan kemik kırılma yükü ve denge gücünde azalma ve azalan kortikal kalınlık (308), trabeküler kemik yapısı ve genel trabekülyasyonda azalma rapor edilmiştir (309). B6'nın kemik formasyonunda alkalen fosfataz substratı olarak görev aldığını ve osteoblast ve osteoklastlar arasındaki bağlantıda rol aldığını öne süren bir çalışma da

vardır (310). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada düşük serum vitamin B6 konsantrasyonuna sahip bireylerde kansellöz kemik yapısında minör değişiklikler görülürken, düşük serum vitamin B12 konsantrasyonu ve bozulan kansellöz kemik yapısı arasında ilişki olmadığı bulunmuştur (311). Yetersiz vitamin B12 alımı çeşitli oral semptomlar gösteren hastalıklarla ilişkilendirilmiştir, bu durum da oral sağlıkta vitamin B12'nin potansiyel rolüne işaret etmektedir (312). Vitamin B12 metiyonin sentezi için kofaktördür (313). Yapılan bir çalışmada B12-eksik anneden doğan farelerin karaciğer hücrelerinin taurin üretmediği bulunmuştur. Fareler düzenli dozda taurin ile beslendiğinde kemiklerinin normal olarak büyüdüğü ve yoğunluğa ulaştığı görülmüştür (183). Taurin, B12 sentezinde rol oynamaktadır ve kemik yapımındaki etkisi de karaciğeri detoksifiye etmesi ve K^+ , Mg^{+2} , Na^{+1} ve Ca^{+2} fonksiyonunda görev alması ile ilişkilidir (170, 171). Vitamin B12 konsantrasyonu ile kemik iliği stromal osteoprogenitor hücreleri ve UMR106 osteoblastik hücrelerine timidin inkorporasyonu gösterilmiş olup, bu bulgular vitamin B12'nin osteoblastik fonksiyonuna direkt etkisi olduğunu göstermektedir (184, 185). Ayrıca *in vitro* bir çalışmada düşük vitamin B12 seviyesinin osteoklastik aktiviteyi arttırdığı gösterilmiştir (186). Vaes BLT ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (314), vitamin B12 eksikliğinin kemik mikroçevresindeki artan homosistein ve metilmalonik asit aracılığı ile osteoklastogenezi uyardığına değinilmiştir. B12 eksikliği büyüme retardasyonu, azalan serum osteokalsin seviyeleri, düşük kemik mineral yoğunluğu ve artan kemik fraktür riski ile ilişkilidir (187, 188, 189, 190). Bizim çalışmamızda enerji içeceği içerisindeki vitaminlerin kemik metabolizması üzerine olası olumlu etkileri tespit edilememiştir.

Bazı enerji içeceklerinin içeriğinde *ginseng*, *ginkgo biloba* ve *arjinin* bulunmasına rağmen, bizim çalışmamızda kullandığımız enerji içeceği (RedBull®/Türkiye) içeriğinde bu maddeler yer almamaktadır. Bu nedenle de kemik metabolizması üzerine bu maddelerin etkinliği başka çalışmalarla kıyaslanamamaktadır. Yine de Sezer ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya bakıldığında (315) ligatür ile indüklenen sıçanlarda *ginkgo biloba* (GB) özütünün sistemik uygulamasının koruyucu etkileri araştırılmıştır. Ligatür alt 1. Molar dişe uygulanmış ve çalışma süresi 11 gün olarak belirlenmiştir. Ligatür bağlanan grupta ligatür bağlanmayan, ligatür bağlanan ve 28 mg/kg GB uygulanan ve ligatür

bağlanan ve 56 mg/kg GB uygulanan gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı daha fazla kemik kaybı olduğu gözlenmiştir. Çalışmada GB özütü uygulamasının hastalığın ilerlemesini azalttığı sonucuna varılmıştır.

Yapılan literatür taramasında bizim çalışmamızla benzer dizaynda bir çalışmaya rastlanılmadığından doğrudan bir kıyaslama yapmak mümkün olmamıştır. Buna rağmen yukarıdaki bilgiler ışığında çalışmamızda sıçanlarda oluşturulan deneysel periodontitis modelinde kronik enerji içeceği kullanımı ile alveolar kemik yıkımının artabileceği, ancak alveolar kemik metabolizması üzerindeki olumsuz etkileri açısından kesin bir sonuca varabilmek için enerji içeceğinin kullanım süresinin arttırıldığı ve içindeki maddelerin tek tek incelenerek bu olumsuz etkinin nedeninin araştırılacağı daha fazla sayıda hayvan ve insan çalışmasına ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamızda periodontal hastalığın oluşum döneminde enerji içeceğinin etkinliğini değerlendirmek için deneysel periodontitis gruplarına uygun teknik olarak 3/0 ipek sütür kullanılarak üst 2. molar dişlere submarjinal olarak ligatür yerleştirilmiştir. Gruplara 2 hafta süreyle oral gavaj yoluyla distile su veya enerji içeceği uygulandıktan sonra sıçanlar sakrifiye edilmiş ve elde edilen doku örnekleri histometrik, immünohistokimyasal ve mikro bilgisayarlı tomografi ile; serum ise biyokimyasal olarak incelenerek enerji içeceğinin alveolar kemik metabolizması üzerindeki etkinliği anlaşılmaya çalışılmıştır.

1. Literatürde periodontal hastalıkta enerji içeceğinin etkisini araştıran bir başka çalışmaya rastlanmamıştır. Bu anlamda ilk çalışma olması nedeniyle önem arz etmektedir.
2. Deneysel periodontitis oluşturulması amaçlanan gruplarda hastalık başarıyla oluşturulmuştur.
3. Tüm çalışma gruplarına gavaj işlemi aynı doz, aynı süre ve aynı kişi tarafından uygulanmıştır. Sıçanlarda gavaj işleminden kaynaklanan bir komplikasyon meydana gelmemiştir.
4. Biyokimyasal incelemede çalışma grupları arasında serum RANKL, serum OPG, serum RANKL/OPG oranı, serum VEGF ve serum FGF₂ açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. İki haftalık enerji içeceği uygulama süresinin sistemik etki oluşturmak için az bir süre olduğu düşünülmektedir.
5. Mikro bilgisayarlı tomografi ile incelemede alveolar kemik kaybı açısından gruplar değerlendirildiğinde enerji içeceği grupları distile su gruplarından fazla olmasına rağmen, anlamlılık bulunamamıştır. Ancak deneysel periodontitis gruplarında sağlıklı gruplardan, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fazla kemik kaybı hesaplanmıştır.
6. Mikro bilgisayarlı tomografi ile incelemede BV, BV/TV, Tb.N, BMD değerleri deneysel periodontitisli gruplarda sağlıklı gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azken, Tb.Sp istatistiksel olarak

anlamli düzeyde fazla bulunmuştur. Ancak enerji içeceği grupları distile su gruplarından farklı olmasına rağmen, fark anlamlı değildir. Mikro BT de incelenen kesit sayılarının artırılması ile mikrobilgisayarlı tomografi ile değerlendirilen parametrelerde anlamlı farklılıkların oluşturulabileceği düşünülmektedir.

7. Histometrik olarak hesaplanan alveolar kemik kaybı ise deneysel periodontitisli gruplarda sağlıklı gruplardan ve enerji içeceği gruplarında ise distile su gruplarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fazla bulunmuştur. Altın standart olarak kabul edilen histolojik değerlendirmede çıkan bu sonuçlar enerji içeceğinin alveolar kemik üzerinde olumsuz etkileri olduğunu göstermektedir.
8. İmmünohistokimyasal değerlendirme sonucunda RANKL, OPG ve RANKL/OPG oranı değerlerine bakıldığında deneysel periodontitisli gruplarda sağlıklı gruplara ve enerji içeceği gruplarında distile su gruplarına göre bu parametrelerde kemik kaybı lehine farklılıklar tespit edilmiştir.
9. Enerji içeceğinin kompleks yapısından dolayı alveolar yıkımdaki etkin maddenin ne olduğu tam tespit edilemese de içeriğinde fazlaca bulunan kafein ve sükroz olabileceği düşünülmektedir.

Tüm bu sonuçlar dahilinde bu çalışmanın çıkarımı, kronik enerji içeceği kullanımının alveolar kemik yapı üzerinde olumsuz etkisinin bulunduğu yönündedir.

7. KAYNAKÇA

1. **Newman MG, Takei H, Klokkevold PR, Carranza FA.** Carranza's Clinical Periodontology. 11th Ed., St. Louis. Mo. USA: Elsevier Saunders, **2012**.
2. **Armitage GC.** Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontology 2000*, **2004**; 34: 9-21.
3. **Hienz SA, Paliwal S, Ivanovski S.** Mechanisms of Bone Resorption in Periodontitis. *Journal of Immunology Research*, **2015**. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/615486> (13.12.14).
4. **Fishbein L.** Multiple sources of dietary calcium- some aspects of its essentiality. *Regul Toxicol Pharmacol*, **2004**; 39: 67-80.
5. **Rodrigues-Martinez MA and García-Cohen EC.** Role of Ca⁺² and vitamin D in the prevention and treatment of osteoporosis. *Pharmacol Therap*, **2002**; 93: 37-49.
6. **Prentice A, Schoenmakers I, Laskey MA, DeBono S, Ginty F and Godberg GR.** Nutrition and bone growth and development. *Proc Nutr Soc*, **2006**; 65: 348-360.
7. **Heaney RP.** Bone health. *Am J Clin Nutr*, **2007**; 85: 300-303.
8. **Devlin H, Sloan P.** Early bone healing events in the human extraction sockets. *Int J Oral Maxillofac Surg*, **2002**; 31: 641-645.
9. **Seifert SM, Schaechter JL, Hershorin ER, et al.** Health effects of energy drinks on children, adolescents and young adults. *Pediatrics*, **2011**; 127: 511-528.
10. **Hurlock L, Lee MG.** Potential health problems with the use of energy drinks. *West Indian Med J*, **2012**; 61: 1-2.
11. **Dikici S, Aydın LY, Kutlucan A, Ercan N.** Enerji içecekleri hakkında neler biliyoruz? *Dicle Tıp Dergisi*, **2012**; 39(4): 5.
12. **Kopacz A, Warwryniak A, Hamulka J, et al.** Evaluation of energy drink intake in selected student groups. *Rocz Panstw Zakl Hig*, **2013**; 64: 49-53.
13. **Ivy JL, Kammer L, Ding Z, et al.** Improved cycling time-trial performance after ingestion of a caffeine energy drink. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*, **2009**; 19: 61-78.
14. **Tek M, Toptas O, Akkas I, Kazancıoğlu HO, Fırat T, Ezirganlı S, et al.** Effects of energy drinks on soft tissue healing. *J Craniofacial Surg*, **2014**; 25(6): 2048-2088.
15. **Williams RC.** Periodontal disease. *The New England Journal of Medicine*, **1990**; 322: 373-382.
16. **Petersen PE, Ogawa H.** Strengthening the prevention of periodontal disease: the WHO approach. *Journal of Periodontology*, **2005**; 76: 2187-2193.
17. **Beck JD, Offenbacher S.** Systemic effects of periodontitis: epidemiology of periodontal disease and cardiovascular disease. *Journal of Periodontology*, **2005**; 76: 2089-2100.

18. **Listgarten MA.** Nature of periodontal diseases: pathogenic mechanisms. *Journal of Periodontal Research*, **1987**; 22: 172-178.
19. **Bullon P, Newman HN, Battino M.** Obesity, diabetes mellitus, atherosclerosis and chronic periodontitis: a shared pathology via oxidative stress and mitochondrial dysfunction? *Periodontology 2000*, **2014**; 64: 139-153.
20. **Zare Javid A, Seal CJ, Heasman P, Moynihan PJ.** Impact of a customised dietary intervention on antioxidant status, dietary intakes and periodontal indices in patients with adult periodontitis. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, **2014**; 27(6); 523-532.
21. **Armitage GC.** Classifying periodontal diseases-a long-standing dilemma. *Periodontology 2000*, **2002**; 30: 9-23.
22. **Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR, Carranza FA.** Chronic Periodontitis. In: Novak MJ, Novak KF. Eds. Carranza's Clinical Periodontology, 11th ed., St. Louis. Missouri USA: Elsevier Saunders, **2012**: 160-164.
23. **Lindhe J, Okamoto H, Yoneyama T, Haffajee A, Socransky SS.** Longitudinal changes in periodontal disease in untreated subjects. *Journal of Clinical Periodontology*, **1989**; 16: 662.
24. **Lang NP, Schatzle MA, Loe H.** Gingivitis as a risk factor in periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*, **2009**; 36: 3-8.
25. **Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR, Carranza FA.** Periodontal Microbiology. In: Teughels W, Quirynen M, Jakubovics N. Eds. Carranza's Clinical Periodontology, 11th ed., St. Louis. Missouri USA: Elsevier Saunders, **2012**: 241.
26. **Haffajee AD, Socransky SS.** Microbiology of periodontal diseases: introduction. *Periodontology 2000*, **2005**; 38: 9-12.
27. **Wolf HF, Rateitschak EM, Rateitschak KH.** Parodontologie. Çeviri: Hatipoğlu H. Periodontoloji. 3. Baskı. Ankara: Palme Yayınları; **2007**: 95-118.
28. **Albandar JM.** Periodontal diseases in North America. *Periodontology 2000*, **2002**; 29: 31-69.
29. **Hyman JJ, Reid BC.** Epidemiologic risk factors for periodontal attachment loss among adults in the United States. *Journal of Clinical Periodontology*, **2003**; 30: 230-237.
30. **Sandberg GE, Sundberg HE, Fjellstrom CA, Wikblad KF.** Type 2 diabetes and oral health: a comparison between diabetic and non-diabetic subjects. *Diabetes Research and Clinical Practice*, **2000**; 50: 27-34.
31. **Ronderos M, Ryder MI.** Risk assessment in clinical practice. *Periodontology 2000*, **2004**; 34: 120-135.
32. **Deas DE, Mackey SA, McDonnell HT.** Systemic disease and periodontitis: Manifestations of neutrophil dysfunction. *Periodontology 2000*, **2003**; 32: 82-104.
33. **Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW.** Periodontal diseases. *The Lancet*, **2005**; 366: 1809-2180.
34. **Ritchie CS, Kinane DF.** Nutrition, inflammation, and periodontal disease. *Nutrition*, **2003**; 19: 475-476.
35. **Reddy MS.** Osteoporosis and periodontitis: discussion, conclusions, and recommendations. *Annals of Periodontology*, **2001**; 6: 214-217.

36. **Kinane DF.** Periodontitis modified by systemic factors. *Annals Periodontology*, **1999**; 4: 54-64.
37. **Graves D.** Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *Journal of Periodontology*, **2008**; 79: 1585-1591.
38. **Kinane DF.** Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontology 2000*, **2001**; 25: 8-20.
39. **Page RC, Schroeder HE.** Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Laboratory Investigation*, **1976**; 34: 235-249.
40. **Cekici A, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE.** Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontology 2000*, **2014**; 64: 57-80.
41. **Ishikawa I, Aoki A, Takasaki AA, Mizutani K, Sasaki KM, Izumi Y.** Application of lasers in periodontics: true innovation or myth? *Periodontology 2000*, **2009**; 50: 90-126.
42. **Van Dyke TE, Kornman KS.** Inflammation and factors that may regulate inflammatory response. *Journal of Periodontology*, **2008**; 79: 1503-1507.
43. **Newman MG, Takei HH, Klokavold PR.** Microbial Interactions with the Host in Periodontal Diseases. In: Nisengard RJ, Haake SK, Newman MG, Miyasaki KT. Eds. Carranza's Clinical Periodontology, 10th ed., Philadelphia London New York St. Louis Sydney Toronto: W.B Saunders Company; **2006**: 234-235.
44. **Zadeh HH, Nichols FC, Miyasaki KT.** The role of the cell-mediated immune response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis. *Periodontology 2000*, **1999**; 20: 239-288.
45. **Rietschel ET, Brade H.** Bacterial endotoxins. *Scientific American*, **1992**; 267: 54- 61.
46. **Gelani V, Fernandes AP, Gasparoto TH, Garlet TP, Cestari TM, Lima HR, et al.** The role of toll-like receptor 2 in the recognition of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Journal of Periodontology*, **2009**; 80: 2010-2019.
47. **Haffajee AD, Dibart S, Kent Jr. RL, Socransky SS.** Factors associated with different responses to periodontal therapy. *Journal of Clinical Periodontology*, **1995**; 22: 628-636.
48. **Kermen E.** Deneysel Periodontitis Oluşturulmuş Ratlarda Karvakrol Uygulamasının Periodontal Dokular Üzerine Olan Etkilerinin Biyokimyasal, Histolojik ve Radyolojik Olarak İncelenmesi., Periodontoloji Doktora Tezi, *Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Erzurum, **2014**: 123s.
49. **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: 216-248.
50. **Ara T, Kurata K, Hirai K, Uchihashi T, Uematsu T, Imamura Y, et al.** Human gingival fibroblasts are critical in sustaining inflammation in periodontal disease. *Journal of Periodontal Research*, **2009**; 44: 21-27.
51. **Billack B.** Macrophage activation: role of toll-like receptors, nitric oxide, and nuclear factor kappa B. *The American Journal of Pharmaceutical Education*, **2006**; 70: 102.

52. **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: 1349-1363.
53. **Salvi GE, Lang NP.** Host response modulation in the management of periodontal diseases. *Journal of Clinical Periodontology*, **2005**; 32 (6): 108-129.
54. **Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, et al.** Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, **1997**; 89: 309-319.
55. **Bingham III CO.** Periodontal Disease and Rheumatoid Arthritis. [http://www.hopkinsarthritis.org/physician-corner/rheumatology-rounds/round-34-periodontal-disease-and-rheumatoid-arthritis/\(9.07.10\).](http://www.hopkinsarthritis.org/physician-corner/rheumatology-rounds/round-34-periodontal-disease-and-rheumatoid-arthritis/(9.07.10).)
56. **Abu-Amer Y.** NF-kappaB signaling and bone resorption. *Osteoporosis International*, **2013**; 24: 2377-2386.
57. **Li Q and Verma IM.** NF-κB regulation in the immun system. *Nature Reviews*, **2002**; 2: 725-735.
58. **Arabaci T, Kose O, Kizildag A, Albayrak M, Cicek Y, Kara A.** Role of nuclear factor kappa-B in phenytoin-induced gingival overgrowth. *Oral Diseases*, **2014**; 20: 294-300.
59. **Tsuda E, Goto M, Mochizuki S, Yano K, Kobayashi F, Morinaga T, Higashio K.** Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, **1997**; 234: 137-142.
60. **Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, et al.** A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*, **1997**; 390: 175-179.
61. **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. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1998**; 95: 3597-3602.
62. **Boyce BF, Xing L, Chen D.** Osteoprotegerin. the bone protector. is a surprising target for beta-catenin signaling. *Cell Metabolism*, **2005**; 2: 344-345.
63. **Udagawa N, Takahashi N, Jimi E, et al.** Osteoblasts/stromal cells stimulate osteoclast activation through expression of osteoclast differentiation factor/RANKL but not macrophage colony-stimulating factor: receptor activator of NF-kappa B ligand. *Bone*, **1999**; 25(5): 517-523.
64. **Kawai T, Matsuyama T, Hosokawa Y, et al.** B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *Am J Pathol*, **2006**; 169: 987-998.
65. **Blair JM, Zhou H, Seibel MJ, Dunstan CR.** Mechanisms of disease: roles of OPG, RANKL and RANK in the pathophysiology of skeletal metastasis. *Nature Clinical Practice Oncology*, **2006**; 3: 41-49.
66. **Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, Kawakami A, Eguchi K, Sasaki H, Sakai H.** Protein expression and functional difference of membrane bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2000**; 275(3): 768-765.

67. **Schoppet M, Preissner KT, Hofbauer LC.** RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, **2002**; 22: 549-553.
68. **Boyce BF, Xing L.** Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Research & Therapy*, **2007**; 9(1): 1.
69. **Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, Fortun Y, Redini F, Heymann D.** The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, **2004**; 15: 457-475.
70. **Stejskal D, Bartek J, Pastorkova R, Ruzicka V, Oral I, Horalik D.** Osteoprotegerin, RANK, RANKL. *Biomed Papers*, **2001**; 145(2): 61-64.
71. **Yun TJ, Tallquist MD, Aicher A, Rafferty KL, Marshall AJ, Moon JJ, et al.** Osteoprotegerin, a crucial regulator of bone metabolism, also regulates B cell development and function. *Journal of Immunology*, **2001**; 166: 1482-1491.
72. **Lerner UH.** New Molecules in the Tumor Necrosis Factor Ligand and Receptor Superfamilies with Importance for Physiological and Pathological Bone Resorption. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, **2004**; 15: 64-81.
73. **Oates TW, Cochran DL.** Bone cell interactions and regulation by inflammatory mediators. *Current Opinion in Periodontology*, **1996**; 3: 34-44.
74. **Bruzzaniti A, Baron R.** Molecular regulation of osteoclast activity. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, **2006**; 7(1-2): 123-139.
75. **Teitelbaum SL.** Bone resorption by osteoclasts. *Science*, **2000**; 289(5484): 1504-1508.
76. **Teitelbaum SL.** Osteoclasts: what do they do and how do they do it? *The American Journal of Pathology*, **2007**; 170(2): 427-435.
77. **Gehron RP.** The biochemistry of bone. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, **1989**; 18(4): 858-902.
78. **Raynal C, Delmas PD, Chenu C.** Bone sialoprotein stimulates in vitro bone resorption. *Endocrinology*, **1996**; 137(6): 2347-2354.
79. **Giannobile WV, Al-Shammari KF, Sarment DP.** Matrix molecules and growth factors as indicators of periodontal disease activity. *Periodontology 2000*, **2003**; 31: 125-134.
80. **Wiebe SH, Hafezi M, Sandhu HS, Sims SM, Dixon SJ.** Osteoclast activation in inflammatory periodontal diseases. *Oral Diseases*, **1996**; 2(2): 167-180.
81. **Tang CH, Yang RS, Chen YF, Fu WM.** Basic fibroblast growth factor stimulates fibronectin expression through phospholipase C gamma, protein kinase C alpha, c-Src, NF-kappaB, and p300 pathway in osteoblasts. *Journal of Cellular Physiology*, **2007**; 211: 45-55.
82. **Marie PJ.** Fibroblast growth factor signaling controlling osteoblast differentiation. *Gene*, **2003**; 316: 23-32.
83. **Farhadi J, Jaquiere C, Barbero A, Jakob M, Schaeren S, Pierer G, et al.** Differentiation-dependent up-regulation of BMP-2, TGFbeta1, and VEGF expression by FGF-2 in human bone marrow stromal cells. *Plastic Reconstructive Surgery*, **2005**; 116: 1379-86.

84. **Sato Y, Kikuchi M, Ohata N, Tamura M, Kuboki Y.** Enhanced cementum formation in experimentally induced cementum defects of the root surface with the application of recombinant basic fibroblast growth factor in collagen gel in vivo. *Journal of Clinical Periodontology*, **2004**; 75: 243-8.
85. **Hakki SS, Nohutcu RM, Hakki EE, Berry JE, Akkaya MS, Somerman MJ.** Dexamethasone and basic-fibroblast growth factor regulate markers of mineralization in cementoblasts in vitro. *Journal of Periodontology*, **2005**; 76: 1550-8.
86. **Fakhry A, Ratisoontorn C, Vedhachalam C, Salhab I, Koyama E, Leboy P, et al.** Effects of FGF-2/-9 in calvarial bone cell cultures: Differentiation stage-dependent mitogenic effect, inverse regulation of BMP-2 and noggin, and enhancement of osteogenic potential. *Bone*, **2005**; 36: 254-66.
87. **Okada-ban M, Thiery JP, Jouanneau J.** Fibroblast growth factor-2. *IJBCB*, **2000**; 32: 263-267.
88. **Testa U, Pannitteri G, Condorelli GL.** Vascular endothelial growth factors in cardiovascular medicine. *J Cardiovasc Med*, **2008**; 9: 1190-221.
89. **Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J.** The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*, **2003**; 9: 669-76.
90. **Deckers MM, van Bezooijen RL, van Der Horst G, Hoogendam J, van Der Bent C, Papapoulos SE, et al.** Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. *Endocrinology*, **2002**; 143: 1545-53.
91. **Bluteau G, Julien M, Magne D.** VEGF and VEGF receptors are differentially expressed in chondrocytes. *Bone*, **2007**; 40: 568-76.
92. **Zhang F, Richards L, Angel MF, Zhang J, Liu H, Dorsett-Martin W, Lineaweaver WC.** Accelerating flap maturation by vascular endothelium growth factor in a rat tube flap model. *Br J Plast Surg*, **2002**; 55: 59-63.
93. **Gebauer GP, Lin SS, Beam HA, Vieira P, Parsons JR.** Low-intensity pulsed ultrasound increases the fracture callus strength in diabetic BB Wistar rats but does not affect cellular proliferation. *J Orthop Res*, **2002**; 20(3): 587-92.
94. **Mayr-Wohlfart U, Waltenberger J, Hausser H.** Vascular endothelial growth factor stimulates chemotactic migration of primary human osteoblasts. *Bone*, **2002**; 30: 472-7.
95. **Mishima Y, Lotz M.** Chemotaxis of human articular chondrocytes and mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, **2008**; 26: 1407-12.
96. **Sarahrudi K, Thomas A, Braunsteiner T, Wolf H, Vecsei V, Aharinejad S.** VEGF serum concentrations in patients with long bone fractures: a comparison between impaired and normal fracture healing. *J Orthop Res*, **2009**; 27: 1293-7.
97. **Phillips AM.** Overview of the fracture healing cascade. *Injury*, **2005**; 36: 5-7.
98. **Garant PR.** Oral Cells and Tissues. 1st Ed., Kanada: Quintessence Publishing Co, Inc., **2003**.
99. **Bar-Shavit Z.** The osteoclast: a multinucleated, Hematopoietic origin, bone-resorbing osteoimmune cell. *Journal of Cellular Biochemistry*, **2007**; 102(5): 1130-1139.
100. **Saffar JL, Lasfargues JJ, Cherruau M.** Alveolar bone and the alveolar process: the socket that is never stable. *Periodontology 2000*, **1997**; 14(1): 76-90.

101. **Liu D, Xu JK, Figliomeni L, 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.
102. **Nagasawa T, Kiji M, Yashiro R, et al.** Roles of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin in periodontal health and disease. *Periodontology 2000*, **2007**; 43(1): 65–84.
103. **Udagawa N, Sato N, Yang S, et al.** “Signal transduction of lipopolysaccharide-induced osteoclast differentiation.” *Periodontology 2000*, **2007**; 43(1): 56–64.
104. **Zou W, Bar-Shavit Z.** Dual modulation of osteoclast differentiation by lipopolysaccharide. *Journal of Bone and Mineral Research*, **2002**; 17(7): 1211–1218.
105. **Bord S, Horner A, Hembry RM, Reynolds JJ, Compston JE.** Production of collagenase by human osteoblasts and osteoclasts in vivo. *Bone*, **1996**; 19(1): 35–40.
106. **Schwartz Z, Goultchin J, Dean DD, Boyan BD.** Mechanisms of alveolar bone destruction in periodontitis. *Periodontology 2000*, **1997**; 14(1): 158–172.
107. **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 and Related Research*, **1982**; 4(1): 1–6.
108. **Gruber R.** Molecular and Cellular Basis of Bone Resorption. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, **2015**; 165 (3): 48-53.
109. **Baron R.** Molecular mechanisms of bone resorption by the osteoclast. *Anatomical Record*, **1989**; 224(2): 317–324.
110. **Baron R.** Molecular mechanisms of bone resorption. An update. *Acta Orthopaedica Scandinavica Supplement*, **1995**; 66 (266): 66–70.
111. **Zaidi M, Blair HC, Moonga BS, Abe E, Huang CL-H.** Osteoclastogenesis, bone resorption and osteoclast-based therapeutics. *Journal of Bone and Mineral Research*, **2003**; 18(4): 599–609.
112. **Nanci A, Bosshardt DD.** Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontology 2000*, **2006**; 40(1): 11–28.
113. **Gruber R.** Cell biology of osteoimmunology. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, **2010**; 160 (17-18): 438–445.
114. **Kaji H, Sugimoto T, Kanatani M, et al.** Carboxyl-terminal parathyroid hormone fragments stimulate osteoclast-like cell formation and osteoclastic activity. *Endocrinology*, **1994**; 134(4): 1897–1904.
115. **McCauley LK, Nohutcu RM.** Mediators of periodontal osseous destruction and remodeling: principles and implications for diagnosis and therapy. *Journal of Periodontology*, **2002**; 73(11): 1377–1391.
116. **Taubman MA, Valverde P, Han X, Kawai T.** Immune response: the key to bone resorption in periodontal disease. *Journal of Periodontology*, **2005**; 76(11): 2033–2041.
117. **Ebersole JL.** Humoral immune responses in gingival crevice fluid: local and systemic implications. *Periodontology 2000*, **2003**; 31: 135–166.

118. **Ebersole JL, Dawson DR, Morford LA, Peyyala R, Miller CS, and Gonzal'ez OA.** Periodontal disease immunology: "double indemnity" in protecting the host. *Periodontology* 2000, **2013**; 62(1): 163–202.
119. **Gupta G.** Gingival crevicular fluid as a periodontal diagnostic indicator-II: inflammatory mediators. host-response modifiers and chair side diagnostic aids. *Journal of Medicine and Life*, **2013**; 6(1): 7–13.
120. **Lamster IB, Novak MJ.** Host mediators in gingival crevicular fluid: implications for the pathogenesis of periodontal disease. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, **1992**; 3(1-2): 31–60.
121. **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*, **2000**; 15(1): 2–12.
122. **Jin Q, Cirelli JA, Park CH, et al.** RANKL inhibition through osteoprotegerin blocks bone loss in experimental periodontitis. *Journal of Periodontology*, **2007**; 78(7): 1300–1308.
123. **Han X, Kawai T, Taubman MA.** Interference with immune-cell-mediated bone resorption in periodontal disease. *Periodontology* 2000, **2007**; 45(1): 76–94.
124. **Ohlrich EJ, Cullinan MP, Seymour GJ.** The immunopathogenesis of periodontal disease. *Australian Dental Journal*, **2009**; 54(1): 2–10.
125. **Di Benedetto A, Gigante I, Colucci S, Grano M.** Periodontal disease: linking the primary inflammation to bone loss. *Clinical and Developmental Immunology*, **2013**. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/503754> (6.05.2013).
126. **Belibasakis GN, Bostanci N.** The RANKL-OPG system in clinical periodontology. *Journal of Clinical Periodontology*, **2012**; 39(3): 239–248.
127. **Taubman MA, Kawai T.** Involvement of T-lymphocytes in periodontal disease and in direct and indirect induction of bone resorption. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, **2001**; 12(2): 125–135.
128. **AlShwaimi E, Berggreen E, Furusho H, et al.** IL-17 receptor a signaling is protective in infection-stimulated periapical bone destruction. *Journal of Immunology*, **2013**; 191(4): 1785–1791.
129. **Gaffen SL, Hajishengallis G.** A new inflammatory cytokine on the block: re-thinking periodontal disease and the Th1/Th2 paradigm in the context of Th17 cells and IL-17. *Journal of Dental Research*, **2008**; 87(9): 817–828.
130. **Darveau RP.** Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nature Reviews Microbiology*, **2010**; 8(7): 481–490.
131. **Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent Jr RL.** Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology*, **1998**; 25(2): 134–144.
132. **Hajishengallis G, Liang S, Payne MA, et al.** Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement." *Cell Host and Microbe*, **2011**; 10(5): 497–506.
133. **Kinney JS, Morelli T, Oh M, et al.** Crevicular fluid biomarkers and periodontal disease progression. *Journal of Clinical Periodontology*, **2014**; 41(2): 113–120.

134. Grosskinsky S, Schott M, Brenner C, Cutler SJ, Simon MM, Wallich R. Human complement regulators C4b-binding protein and C1 esterase inhibitor interact with a novel outer surface protein of *Borrelia recurrentis*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **2010**; 4(6).
135. Miller DP, McDowell JV, Bell JK, Goetting-Minesky MP, Fenno JC, Marconi RT. Analysis of the complement sensitivity of oral treponemes and the potential influence of FH binding. FH cleavage and dentilisin activity on the pathogenesis of periodontal disease. *Molecular Oral Microbiology*, **2014**; 29(5): 194–207.
136. Spyraakis F, Cellini B, Bruno S, et al. Targeting Cystalyisin, a virulence factor of *treponema denticola*-supported periodontitis. *ChemMedChem*, **2014**; 9(7): 1501–1511.
137. Posch G, Sekot G, Friedrich V, et al. Glycobiology aspects of the periodontal pathogen *Tannerella forsythia*. *Biomolecules*, **2012**; 2(4): 467–482.
138. Settem RP, Honma K, Nakajima T, et al. A bacterial glycan core linked to surface (S)-layer proteins modulates host immunity through Th17 suppression. *Mucosal Immunology*, **2013**; 6(2): 415–426.
139. Underhill DM, Ozinsky A. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Current Opinion in Immunology*, **2002**; 14(1): 103–110.
140. Darveau RP. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nature Reviews Microbiology*, **2010**; 8: 481–490.
141. Mark Bartold P, van Dyke TE. Periodontitis: a host mediated disruption of microbial homeostasis. Unlearning learned concepts. *Periodontology 2000*, **2013**; 62(1): 203–217.
142. Dumitrescu AL, El-Aleem SA, 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.
143. Herath TDK, Darveau RP, Seneviratne CJ, Wang C-Y, Wang Y, Jin L. Tetra- and penta-acylated lipid A structures of *Porphyromonas gingivalis* LPS differentially activate TLR4-mediated NF-kappaB signal transduction cascade and immuno-inflammatory response in human gingival fibroblasts. *PLoS ONE*, **2013**; 8(3). 10.1371/journal.pone.0058496 (12.03.2013).
144. Jain S, Coats SR, Chang AM, Darveau RP. A novel class of lipoprotein lipase-sensitive molecules mediates toll-like receptor 2 activation by *Porphyromonas gingivalis*. *Infection and Immunity*, **2013**; 81(4): 1277–1286.
145. Slocum C, Coats SR, Hua N, et al. Distinct lipid moieties contribute to pathogen induced site-specific vascular inflammation. *PLoS Pathogens*, **2014**. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1004215> (10.07.2014).
146. Delmas PD. Treatment of postmenopausal osteoporosis. *Lancet*, **2002**; 359: 2018–2026.
147. Skewes MC, Decou CR, Gonzalez VM. Energy drink use, problem drinking and drinking motives in a diverse sample of Alaskan college students. *Int J Circumpolar Health*, **2013**; 72. <http://dx.doi.org/10.3402/ijch.v72i0.21204>.
148. Malinauskas BM, Aeby VG, Overton RF, et al. A survey of energy drinks consumption patterns among college students. *Nutr J*, **2007**; 6: 35.
149. Conlisk AJ, Galuska DA. Is caffeine associated with bone mineral density in young adult women? *Prev Med*, **2000**; 31: 562–568.

150. **Jones G.** Caffeine and other sympathomimetic stimulant: modes of actions and effects on sportsperformance. *Essays Biochem*, **2008**; 44(1):109-123.
151. **Azam S, Hadi N, Khan NU, Hadi SM.** Antioxidant and pro-oxidant properties of caffeine. theobromine and xanthine. *Med Sci Monit*, **2003**; 9: 325–330.
152. **Kamagata-Kikyouura Y, Ohta M, Cheuk G, Yazdani M, Saltzman MJ, Nakamoto T.** Combined effects of caffeine and prostaglandin E2 on the proliferation of osteoblast-like cells. *J Periodont*, **1999**; 70: 283-288.
153. **Massey LK, Whiting SJ.** Caffeine, urinary calcium, calcium metabolism and bone. *J Nutr*, **1993**; 123: 1611-1614.
154. **Rapuri PB, Gallagher JC, Nawaz Z.** Caffeine decreases vitamin D receptor protein expression and 1,25(OH)2D3 stimulated alkaline phosphatase activity in human osteoblast cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **2007**; 103: 368-371.
155. **Ilich JZ, Brownbill RA, Tamborini L, Crncevic-Orlic Z.** To drink or not to drink: how are alcohol, caffeine and past smoking related to bone mineral density in elderly women? *J Am Coll Nutr*, **2002**; 21: 536–44.
156. **Tsuang YH, Sun JS, Chen LT, Sun SC, Chen SC.** Direct effects of caffeine on osteoblastic cells metabolism: the possible causal effect of caffeine on the formation of osteoporosis. *J Orthop Surg Res*, **2006**; 7: 1–7.
157. **Tassinari MS, Gerstenfeld LC, Stein GS, Lian JB.** Effect of caffeine on parameters of osteoblast growth and differentiation of a mineralized extracellular matrix in vitro. *Bone Miner Res*, **1991**; 6: 1029–36.
158. **Wink CS, Rossowska MJ, Nakamoto T.** Effects of caffeine on bone cells and bone development in fast-growing rats. *Anat Rec*, **1996**; 246: 30–8.
159. **Gorustovich AA, Steimetz T, Nielsen FH, Guglielmotti MB.** Histomorphometric study of alveolar bone healing in rats fed a boron-deficient diet. *Anat Rec*, **2008**; 291: 441-447.
160. **Giris M, Depboylu B, Dogru-Abbasoglu S, et al.** Effect of taurine on oxidative stress and apoptosis-related protein expression in trinitrobenzene sulphonic acidinduced colitis. *Clin Exp Immunol*, **2008**; 152: 102-110.
161. **Huxtable RJ.** Physiological actions of tauine. *Physiol Rev*, **1992**; 72: 101-163.
162. **Dincer S, Babul A, Erdogan D, Ozogul C, Dincer SL.** Effect of taurine on wound healing. *Amino Acids*, **1996**; 10: 59-71.
163. **Degim Z, Celebi N, Sayan H, Babul A, Erdogan D, Take G.** An investigation on skin wound healing in mice with a taurine-chitosan gel formulation. *Amino Acids*, **2002**; 22: 187-198.
164. **Fisher C, Gilbertson-Beadling S, Powers EA, Petzold G, Poorman R, Mitchell MA.** Interstitial collagenase is required for angiogenesis in vitro. *Development biology*, **1994**; 162(2): 499-510.
165. **Gultekin SE, Senguven B, Sofuoglu A, Taner L, Koch M.** Effect of the topical use of the antioxidant taurine on the two basement membrane proteins of regenerating oral gingival epithelium. *J Periodontol*, **2012**; 83: 127-134.
166. **Kim SJ, Lee HW, Gupta RC.** Taurine, Bone Growth and Bone Development. *Current Nutrion & Food Science*, **2008**; 4(2): 135-144.

167. **Koide M, Okahashi N, Tanaka R, Kazuno K, Shibasaki K, Yamazaki Y, et al.** Inhibition of experimental bone resorption and osteoclast formation and survival by 2-aminoethanesulphonic acid. *Arch. Oral Biol*, **1999**; 44: 711- 719.
168. **Park S, Kim H, Kim SJ.** Stimulation of ERK2 by taurine with enhanced alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in osteoblast-like UMR-106 cells. *Biochem Pharmacol*, **2002**; 62: 1107-1111.
169. **Yasutomi C, Nakamuta H, Fujita T, Takenaga T, Koida M.** Anti-osteopenic effect of taurine: possible involvement of activated MEK-ERK-Cbfa1 signaling. *Nippon Yakurigaku Zasshi*, **2002**; 120: 114-115.
170. **Liu HY, Chi FL, Gao WY.** Taurine modulates calcium influx under normal and ototoxic conditions in isolated cochlear spiral ganglion neurons. *Pharmacol Rep*, **2008**; 60(4): 508-13.
171. **Wu C, Kennedy DO, Yano Y, et al.** Thiols and polyamines in the cytoprotective effect of taurine on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *J Biochem Mol Toxicol*, **1999**; 13(2): 71-6.
172. **Kolaczowska E, Kubes P.** Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature reviews Immunology*, **2013**; 13(3): 159-175.
173. **Andrew PJ, Mayer B.** Enzymatic function of nitric oxide synthases (review). *Cardiovascular Research*, **1999**; 43(3): 521-31.
174. **Alba-Roth J, Müller OA, Schopohl J, von Werder K.** Arginine stimulates growth hormone secretion by suppressing endogenous somatostatin secretion. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **1988**; 67(6): 1186-9.
175. **Baecker N, Boese A, Schoenau E, Gerzer R, Heer M.** L-Arginine, the Natural Precursor of NO, Is Not Effective for Preventing Bone Loss in Postmenopausal Women. *Journal of Bone and Mineral Research*, **2005**; 20: 471-479.
176. **Williams JZ, Abumrad N, Barbul A.** Effect of a specialized amino acid mixture on human collagen deposition. *Annals of Surgery*, **2002**; 236(3): 369-375.
177. **Choi MJ, Chang KJ.** Effect of Dietary Taurine and Arginine Supplementation on Bone Mineral Density in Growing Female Rats. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **2013**; 776: 335-345.
178. **Thompson C, Fuhrman MP.** Nutrients and wound healing: still searching for the magic bullet. *Nutr Clin Pract*, **2005**; 20: 331-347.
179. **Bâ A.** Metabolic and structural role of thiamine in nervous tissues. *Cell Mol Neurobiol*, **2008**; 28(7): 923-31.
180. **Lakshmi AV.** Riboflavin metabolism-relevance to human nutrition. *Indian J MedRes*, **1998**; 108: 182-90.
181. **Sauve AA.** NAD⁺ and vitamin B3: from metabolism to therapies. *J Pharmacol Exp Ther*, **2007**; 324(3): 883-93.
182. **Spinneker A, Sola R, Lemmen V, Castillo MJ, Pietrzik K, González-Gross M.** Vitamin B6 status, deficiency and its consequences--an overview. *NutrHosp*, **2007**; 22(1): 7-24.
183. **Balla T.** Regulation of Ca²⁺ entry by inositol lipids in mammalian cells by multiple mechanisms. *Cell Calcium*, **2009**; 45(6): 527-34.

184. **Garcia PR, Gonzalez IQ, Mottram L, et al.** Vitamin B12–dependent taurine synthesis regulates growth and bone mass. *Journal of Clinical Investigation*, **2014**; 127(7): 2988-3002.
185. **Kim GS, Kim CH, Park JY, Lee KU, et al.** Effects of vitamin B12 on cell proliferation and cellular alkaline phosphatase activity in human bone marrow stromal osteoprogenitor cells and UMR106 osteoblastic cells. *Metabolism*, **1996**; 45: 1443-6.
186. **Choi SW, Friso S, Ghandour H, Bagley PJ, et al.** Vitamin B-12 deficiency induces anomalies of base substitution and methylation in the DNA of rat colonic epithelium. *J Nutr*, **2004**; 134: 750-5.
187. **Herrmann M, Schmidt J, Umanskaya N, Colaianni G, Al Marrawi F, Widmann T, Zallone A, et al.** Stimulation of osteoclast activity by low B-vitamin concentrations. *Bone*, **2007**; 41: 584-91.
188. **Goerss JB, Kim CH, Atkinson EJ, Eastell R, O’Fallon WM, Melton LJ.** Risk of fractures in patients with pernicious anemia. *J Bone Miner Res*, **1992**; 7(5): 573–579.
189. **Dhonukshe-Rutten RA, van Dusseldorp M, Schneede J, de Groot LC, van Staveren WA.** Low bone mineral density and bone mineral content are associated with low cobalamin status in adolescents. *Eur J Nutr*, **2005**; 44(6): 341–347.
190. **Tucker KL, et al.** Low plasma vitamin B12 is associated with lower BMD: the Framingham Osteoporosis Study. *J Bone Miner Res*, **2005**; 20(1): 152–158.
191. **Morris MS, Jacques PF, Selhub J.** Relation between homocysteine and B-vitamin status indicators and bone mineral density in older Americans. *Bone*, **2005**; 37(2): 234–242.
192. **Merriman NA, Putt ME, Metz DC, Yang YX.** Hip fracture risk in patients with a diagnosis of pernicious anemia. *Gastroenterology*, **2010**; 138(4): 1330–1337.
193. **Espinola EB, Dias RF, Mattei R, Carlini EA.** Pharmacological activity of guarana (*Paullinia cupana* Mart.) in laboratory animals. *Journal of Ethnopharmacology*, **1997**; 55: 223–229.
194. **Basile A, Ferrara L, Pezzo MD, Mele G, Sorbo S, Bassi P, Montesano D.** Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana*. *J Ethnopharmacol*, **2005**; 102(1): 32-6.
195. **Rowe DJ, Baker AC.** Perioperative Risks and Benefits of Herbal Supplements in Aesthetic Surgery. *Aesthetic Surgery Journal*, **2009**; 29: 150-157.
196. **Kim YS, Cho IH, Jeong MJ, Jeong SJ, Nah SY, Cho YS, et al.** Therapeutic Effect of Total Ginseng Saponin on Skin Wound Healing. *J. Ginseng Res*, **2011**; 35(3): 360-367.
197. **Sengupta S, Toh SA, et al.** Modulating Angiogenesis The Yin and the Yang in Ginseng. *Circulation*, **2004**; 110: 1219-1225.
198. **Ban JY, Kang SW, Lee JS, Chung J-H, Ko YG, Choi HS.** Korean red ginseng protects against neuronal damage induced by transient focal ischemia in rats. *Experimental and Therapeutic Medicine*, **2012**; 3: 693-698.
199. **Lu XZ, Wang. JH, Wu X, Zhou L, Wang L, Zhang XW, Cao KJ, Huang J.** Ginsenoside Rg1 promotes bone marrow stromal cells proliferation via the activation of the estrogen receptor-mediated signaling pathway. *Acta Pharmacol.Sin*, **2008**; 29: 1209–1214.
200. **Shi AW, Wang XB, Lu FX, Zhu MM, Kong XQ, Cao KJ.** Ginsenoside Rg1 promotes endothelial progenitor cell migration and proliferation. *Acta Pharmacol. Sin*, **2009**; 30: 299–306.

201. **Gong YS, Chen J, Zhang QZ, Zhang JT.** Effect of 17 β -oestradiol and ginsenoside on osteoporosis in ovariectomised rats. *J. Asian Nat. Prod. Res*, **2006**; 8: 649–656.
202. **Shen Y, Li YQ, Li SP, Ma L, Ding LJ, Ji H.** Alleviation of ovariectomy-induced osteoporosis in rats by *Panax notoginseng* saponins. *J. Nat. Med*, **2010**; 64: 336–345.
203. **Wang P, Wei X, Zhang F, Yang K, Chen Q, Luo H, He L.** Ginsenoside Rg1 of *Panax ginseng* stimulates the proliferation, odontogenic/osteogenic differentiation and gene expression profiles of human dental pulp stem cells. *Phytomedicine*, **2014**; 21: 177–183.
204. **Zhang C, Zhu Y, Wan J, Xu H, Shi H, Lu X.** Effects of *Ginkgo biloba* extract on cell proliferation, cytokines and extracellular matrix of hepatic stellate cells. *Liver International*, **2006**; 26: 1283–1290.
205. **Carvalho R de S, de Souza CM, Neves JC, Holanda-Pinto SA, Pinto LM, Brito GA, de Andrade GM.** Vitamin E does not prevent bone loss and induced anxiety in rats with ligature-induced periodontitis. *Arch Oral Biol*, **2013**; 58(1): 50–8.
206. **Xianxian L, Xiangnan W, Yuanyuan M, Zhichao H, Shenyuan C, Taozi F, et al.** Oral administration of 5-hydroxytryptophan aggravated periodontitis-induced alveolar bone loss in rats. *Achieves of Oral Biology*, **2015**; 60: 789–798.
207. **Barbetta A, Bedini R, Pecci R, Dentini M.** Role of X-ray microtomography in tissue engineering. *Ann Ist Super Sanita*, **2012**; 48(1): 10–18.
208. **Waarsing JH, Day JS, Weinans H.** An improved segmentation method for in vivo microCT imaging. *J Bone Miner Res*, **2004**; 19(10): 1640–1650.
209. **Oz HS, Puleo DA.** Animal models for periodontal disease. *J Biomed Biotechnol*, **2011**; 2011(1): 1–8.
210. **Klausen B.** Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. *J Periodontol*, **1991**; 62(1): 59–73.
211. **Baker PJ, Howe L, Garneau J, Roopenian DC.** T cell knockout mice have diminished alveolar bone loss after oral infection with *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **2002**; 34(1): 45–50.
212. **Zhou Q, Leeman SE, Amar S.** Signaling mechanisms in the restoration of impaired immune function due to diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2011**; 108(7): 2867–2872.
213. **Struillou X, Boutigny H, Soueidan A, Layrolle P.** Experimental animal models in periodontology: a review. *Open Dent J*, **2010**; 4: 37–47.
214. **Tomofuji T, Kusano H, Azuma T, Ekuni D, Yamamoto T, Watanabe T.** Effects of a high-cholesterol diet on cell behavior in rat periodontitis. *J Dent Res*, **2005**; 84(8): 752–756.
215. **Tomofuji T, Azuma T, Kusano H, Sanbe T, Ekuni D, Tamaki N, et al.** Oxidative damage of periodontal tissue in the rat periodontitis model: effects of a highcholesterol diet. *FEBS Lett*, **2006**; 580(15): 3601–3604.
216. **Ekuni D, Tomofuji T, Sanbe T, Irie K, Azuma T, Maruyama T et al.** Periodontitis induced lipid peroxidation in rat descending aorta is involved in the initiation of atherosclerosis. *J Periodontal Res*, **2009**; 44(4): 434–442.
217. **Tomofuji T, Yamamoto T, Tamaki N, Ekuni D, Azuma T, Sanbe T, et al.** Effects of obesity on gingival oxidative stress in a rat model. *J Periodontol*, **2009b**; 80(8): 1324–1329.

218. **Ekuni D, Tomofuji T, Irie K, Kasuyama K, Umakoshi M, Azuma T, et al.** Effects of periodontitis on aortic insulin resistance in an obese rat model. *Lab Invest*, **2010**; 90(3): 348-359.
219. **de Lima V, Bezerra MM, de Menezes Alencar VB, Vidal FD, da Rocha FA, et al.** Effects of chlorpromazine on alveolar bone loss in experimental periodontal disease in rats. *Eur J Oral Sci*, **2000**; 108(2): 123-9.
220. **Kuhr A, Popa-Wagner A, Schmoll H, Schwahn C, Kocher T.** Observations on experimental marginal periodontitis in rats. *J Periodontal Res*, **2004**; 39(2): 101-6.
221. **Di Paola R, Mazzon E, Zito D, Maiere D, Britti D, Genovese T & Cuzzocrea S.** Effects of Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, in a rodent model periodontitis. *J Clin Periodontol*, **2005**; 32: 1062-1068.
222. **Bakır B, Ay ZY, Buyukbayram HI, Doguc DK, Bayram D, Candan IA, Uskun E.** The Effect of Curcumin Treatment on Systemic Th17 Response, Gingival Expression of IL-17 and RORγt and Alveolar Bone Loss in Experimental Periodontitis. *Journal of Periodontology*, **2016**; 87(11): 183-191.
223. **Bhattacharai G, Kook SH, Kim JH, Poudel SB, Lim SS, Seo YK, Lee JC.** COMP-Ang1 prevents periodontitic damages and enhances mandible bone growth in an experimental animal model. *Bone*, **2016**; 92: 168–179.
224. **Goes P, Lima NA, Rodrigues JAG, Benevides NBM, Brito GAC, Lima V.** Anti-inflammatory and Anti-resorptive Effects of Atorvastatin on Alveolar Bone Loss in Wistar Rats. *Brazilian Dental Journal*, **2016**; 27(3): 267-272.
225. **Amstad-Jossi M, Schroeder HE.** Age-related alterations of periodontal structures around the cemento-enamel junction and of the gingival connective tissue composition in germ-free rats. *J Periodontal Res*, **1978**; 13(1): 76-90.
226. **Gomar FS, Leischik R, Lippi G.** Energy drinks: Increasing evidence of negative cardiovascular effects. *International Journal of Cardiology*, **2016**; 206: 153.
227. **Shah SA, Occiano A, Nguyen TA, Chan A, Sky JC, Bhattacharyya M, O'Dell KM, Shek A, Nguyen NN.** Electrocardiographic and blood pressure effects of energy drinks and Panax ginseng in healthy volunteers: A randomized clinical trial. *International Journal of Cardiology*, **2016**; 218: 318–323.
228. **Grasser EK, Yepuri G, Dulloo AG, Montani JP.** Cardio- and cerebrovascular responses to the energy drink Red Bull in young adults: a randomized cross-over study. *Eur J Nutr*, **2014**; 53:1561–1571.
229. **Kozik TM, Shah S, Bhattacharyya M, Franklin TT, Connolly TF, Chien W, Charos GS, Pelter MM.** Cardiovascular responses to energy drinks in a healthy population: The C-energy study. *American Journal of Emergency Medicine*, **2016**; 34: 1205–1209.
230. **Richards G and Smith AP.** Breakfast and Energy Drink Consumption in Secondary School Children: Breakfast Omission, in Isolation or in Combination with Frequent Energy Drink Use, is Associated with Stress, Anxiety, and Depression Cross-Sectionally, but not at 6-Month Follow-Up. *Frontiers in Psychology*, **2016**; 7: 106.
231. **Blair JM, Zheng Y, Dunstan CR.** RANK ligand. *Int J Biochem Cell Biol*, **2007**; 39: 1077-1081.
232. **Lerner UH.** Inflammation-induced bone remodeling in periodontal disease and the influence of post-menopausal osteoporosis. *J Dent Res*, **2006**; 85: 596-607.

233. **Saidenberg-Kermanac'h N, Cohen-Solal M, Bessis N, DeVerne-joul MC, Boissier MC.** Role for osteoprotegerin in rheumatoid inflammation. *Joint Bone Spine*, **2004**; 71: 9-13.
234. **Bostanci N, Ilgenli T, Emingil G, et al.** Gingival crevicular fluid levels of RANKL and OPG in periodontal diseases: Implications of their relative ratio. *J Clin Periodontol*, **2007**; 34: 370-376.
235. **Tang H, Mattheos N, Yao Y, Jia Y, Ma L, Gong P.** In vivo osteoprotegerin gene therapy preventing bone loss induced by periodontitis. *J Periodont Res*, **2015**; 50(4): 434-43.
236. **Tokuyama N, Tanaka S.** Cytokines in bone diseases. Genetic disorders of RANKL RANK-OPG system. *Clin Calcium*, **2010**; 20: 1532–1538.
237. **Horowitz MC, Fretz JA, Lorenzo JA.** How B cells influence bone biology in health and disease. *Bone*, **2010**; 47: 472–479.
238. **Wara-aswapati N, Surarit R, Chayasodom A, Boch JA, Pitiphat W.** RANKL upregulation associated with periodontitis and Porphyromonas gingivalis. *J Periodontol*, **2007**; 78: 1062-1069.
239. **Crotti T, Smith MD, Hirsch R, et al.** Receptor activator NF kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. *J Periodontal Res*, **2003**; 38: 380-387.
240. **Mogi M, Otagoto J, Ota N, Togari A.** Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *J Dent Res*, **2004**; 83: 166-169.
241. **Lu HK, Chen YL, Chang HC, Li CL, Kuo MY.** Identification of the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand system in gingival crevicular fluid and tissue of patients with chronic periodontitis. *J Periodontal Res*, **2006**; 41: 354-360.
242. **Buduneli N, Kinane DF.** Host-derived diagnostic markers related to soft tissue destruction and bone degradation in periodontitis. *J Clin Periodontol*, **2011**; 38 (11): 85–105.
243. **Vernal R, Chaparro A, Graumann R, Puente J, Valenzuela MA & Gamonal J.** Levels of cytokine receptor activator of nuclear factor kappaB ligand in gingival crevicular fluid in untreated chronic periodontitis patients. *Journal of Periodontology*, **2004**; 75: 1586–1591.
244. **Lappin DF, Eapen B, Robertson D, Young J & Hodge PJ.** Markers of bone destruction and formation and periodontitis in type 1 diabetes mellitus. *Journal of Clinical Periodontology*, **2009**; 36: 634–641.
245. **Jabbar S, Drury J, Fordham J, Datta HK, Francis RM & Tuck SP.** Plasma vitamin D and cytokines in periodontal disease and postmenopausal osteoporosis. *Journal of Periodontal Research*, **2011**; 46: 97–104.
246. **Antonoglou G, Knuuttila M, Nieminen P, Vainio O, Hiltunen L, Raunio T, et al.** Serum osteoprotegerin and periodontal destruction in subjects with type 1 diabetes mellitus. *J Clin Periodontol*, **2013**; 40: 765–770.
247. **Booth V, Young S, Cruchley A, Taichman NS, Paleolog E.** Vascular endothelial growth factor in human periodontal disease. *J Periodontal Res*, **1998**; 33: 491–9.
248. **Johnson RB, Serio FG, Dai X.** Vascular endothelial growth factors and progression of periodontal diseases. *J Periodontol*, **1999**; 70: 848–52.

249. **Chapple CC, Kumar RK, Hunter N.** Vascular remodelling in chronic inflammatory periodontal disease. *J Oral Pathol Med*, **2000**; 29: 500–6.
250. **Unlu F, Guneri PG, Hekimgil M, Yesilbek B, Boyacioglu H.** Expression of vascular endothelial growth factor in human periodontal tissues: comparison of healthy and diabetic patients. *J Periodontol*, **2003**; 74: 181–7.
251. **Prapulla DV, Sujatha PB, Pradeep AR.** Gingival crevicular fluid VEGF levels in periodontal health and disease. *J Periodontol*, **2007**; 78:1783–7.
252. **Pradeep AR, Prapulla DV, Sharma A, Sujatha PB.** Gingival crevicular fluid and serum vascular endothelial growth factor: Their relationship in periodontal health, disease and after treatment. *Cytokine*, **2011**; 54: 200–204.
253. **Murakami S.** Periodontal tissue regeneration by signaling molecule(s): what role does basic fibroblast growth factor (FGF-2) have in periodontal therapy? *Periodontol 2000*, **2011**; 56: 188–208.
254. **Murakami S, Takayama S, Kitamura M, Shimabukuro Y, Yanagi K, Ikezawa K, Saho T, Nozaki T, Okada H.** Recombinant human basic fibroblast growth factor (bFGF) stimulates periodontal regeneration in class II furcation defects created in beagle dogs. *J Periodontal Res*, **2003**; 38: 97–103.
255. **Takayama S, Yoshida J, Hirano H, Okada H, Murakami S.** Effects of basic fibroblast growth factor on human gingival epithelial cells. *J Periodontol*, **2002**; 73: 1467–1473.
256. **Zhao YJ, Li Q, Cheng BX, Zhang M and Chen YJ.** Psychological Stress Delays Periodontitis Healing in Rats: The Involvement of Basic Fibroblast Growth Factor. *Mediators of Inflammation*, **2012**. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/732902> (11.11.2012).
257. **Gao J, Jordan TW, Cutress TW.** “Immunolocalization of basic fibroblast growth factor (bFGF) in human periodontal ligament (PDL) tissue,” *Journal of Periodontal Research*, **1996**; 31(4); 260–264.
258. **Theodoro LH, Caiado RC, Longo M, et al.** Effectiveness of the diode laser in the treatment of ligature-induced periodontitis in rats: a histopathological, histometric, and immunohistochemical study. *Lasers Med Sci*, **2015**; 30: 1209–1218.
259. **Ozdemir H, Kara MI, Erciyas K, Ozer H, Ay S.** Preventive effects of thymoquinone in a rat periodontitis model: a morphometric and histopathological study. *J Periodont Res*, **2012**; 47: 74–80.
260. **Xu XC, et al.** Simvastatin prevents alveolar bone loss in an experimental rat model of periodontitis after ovariectomy. *Journal of Translational Medicine*, **2014**; 12: 284.
261. **Toker H, Ozdemir H, Eren K, Ozer H, Sahin G.** N-Acetylcysteine, a Thiol Antioxidant, Decreases Alveolar Bone Loss in Experimental Periodontitis in Rats. *J Periodontol*, **2009**; 80: 672–678.
262. **Yang H, Wen Q, Xue J, Ding Y.** Alveolar bone regeneration potential of a traditional Chinese medicine, Bu-Shen-Gu-Chi-Wan, in experimental periodontitis. *J Periodont Res*, **2014**; 49: 382–389.
263. **Uchiyama T, Tanizawa T, Muramatsu H, Endo N, Takahashi HE, Hara T.** A morphometric comparison of trabecular structure of human ilium between microcomputed tomography and conventional histomorphometry. *Calcif Tissue Int*, **1997**; 61: 493–498.

264. **Klodowski K, Kaminski J, Nowicka K, Tarasiuk J, Wronski S, Swietek M, et al.** Micro-imaging of implanted scaffolds using combined MRI and micro-CT. *Comput Med Imaging Graph*, **2014**; 38(6): 458-468.
265. **Burghardt AJ, Kazakia GJ, Laib A, Majumdar S.** Quantitative assessment of bone tissue mineralization with polychromatic micro-computed tomography. *Calcif Tissue Int*, **2008**; 83: 129–138.
266. **Bedini R, Meleo D, Pecci R, Pacifici L.** The use of microtomography in bone tissue and biomaterial three-dimensional analysis. *Ann Ist Super Sanita*, **2009**; 45(2); 178-184.
267. **Rühli FJ, Kuhn G, Evison R, Müller R, and Schultz M.** Diagnostic Value of Micro-CT in Comparison With Histology in the Qualitative Assessment of Historical Human Skull Bone Pathologies. *American Journal Of Physical Anthropology*, **2007**; 133:1099–1111.
268. **Hedberg EL, Deutman HCK, Shih CK, Lemoine JJ, Liebschner MAK, Miller MJ, Yasko AW, Crowther RS, Carney DH, Mikos AG, and Jansen JA.** Methods: A Comparative Analysis of Radiography, Microcomputed Tomography, and Histology for Bone Tissue Engineering. *Tissue Engineering*, **2005**; 11; 9-10.
269. **Park CH, Abramson ZR, Taba M Jr, et al.** Three-dimensional micro-computed tomographic imaging of alveolar bone in experimental bone loss or repair. *J Periodontol*, **2007**; 78:273–281.
270. **Boyd SK, Davison P, Muller R, Gasser JA.** Monitoring individual morphological changes over time in ovariectomized rats by in vivo micro-computed tomography. *Bone*, **2006**; 39: 854–862.
271. **Gielkens PF, Schortinghuis J, de Jong JR, et al.** A comparison of micro-CT, microradiography and histomorphometry in bone research. *Arch Oral Biol*, **2008**; 53: 558–566.
272. **Bae SH, Ha MH, Choi EY, Choi JI, Choi IS, Kim SJ.** Effects of daidzein on alveolar bone loss and internal microstructures of bone in a rat model of experimental periodontitis: a study using micro-computed tomography. *J Periodont Res*, **2016**; 51(2): 250-256.
273. **Liu YF, Wu LA, Wang J, Wen LY, Wang XJ.** Micro-computerized tomography analysis of alveolar bone loss in ligature- and nicotine-induced experimental periodontitis in rats. *J Periodont Res*, **2010**; 45: 714–719.
274. **Seto H, Toba Y, Takada Y, Kawakami H, Ohba H, Hama H, Horibe M, Nagata T.** Milk basic protein increases alveolar bone formation in rat experimental periodontitis. *J Periodont Res*, **2007**; 42: 85–89.
275. **Glajchen N, Ismail F, Epstein S, Jowell PS, Fallon M.** The effect of chronic caffeine administration on serum markers of bone mineral metabolism and bone histomorphometry in the rat. *Calcif Tissue Int*, **1988**; 43: 277- 280.
276. **Rapuri PB, Gallagher JC, Kinyamu HK, Ryschon KL.** Caffeine intake increases the rate of bone loss in elderly women and interacts with vitamin D receptor genotypes. *Am J Clin Nutr*, **2001**; 74: 694-700.
277. **Heaney RP.** Effects of caffeine on bone and the calcium economy. *Food Chem Toxicol*, **2002**; 40: 1263-1270.
278. **Taylor EN, Curhan GC.** Demographic, dietary, and urinary factors and 24-h urinary calcium excretion. *Clin J Am Soc Nephrol*, **2009**; 4: 1980-1987.

279. **Bezerra JP, de Siqueira A, Pires AG, Marques MR, Duarte PM, Bastos MF.** Effects of Estrogen Deficiency and/or Caffeine Intake on Alveolar Bone Loss, Density and Healing: A study in rats. *J Periodontol*, **2013**; 84: 839-849.
280. **Liu SH, Chen C, Yang RS, Yen YP, Yang YT, Tsai C.** Caffeine enhances osteoclast differentiation from bone marrow hematopoietic cells and reduces bone mineral density in growing rats. *J Orthop Res*, **2011**; 29: 954-960.
281. **Zhou Y, Guan XX, Zhu ZL, et al.** Caffeine inhibits the viability and osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Br J Pharmacol*, **2010**; 161: 1542-1552.
282. **Lu PZ, Lai CY, Chan WH.** Caffeine induces cell death via activation of apoptotic signal and inactivation of survival signal in human osteoblasts. *Int J Mol Sci*, **2008**; 9: 698-718.
283. **Föcking M, Schmiegelt D, Trapp T.** Caffeine-mediated enhancement of glucocorticoid receptor activity in human osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **2005**; 337: 435-9.
284. **Sakamoto W, Nishihira J, Fujie K, et al.** Effect of coffee consumption on bone metabolism. *Bone*, **2001**; 28: 332-336.
285. **Chen X, Whitford GM.** Effects of caffeine on fluoride, calcium and phosphorus metabolism and calcified tissues in the rat. *Arch Oral Biol*, **1999**; 44: 33-39.
286. **Duarte PM, Marques MR, Bezerra JP, Batos MF.** The effects of caffeine administration on the early stage of bone healing and bone density: a histometric study in rats. *Arch Oral Biol*, **2009**; 54: 717-722.
287. **Choi J, Choi SY, Lee SY, Lee JY, Kim HS, Lee SY, Lee NK.** Caffeine enhances osteoclast differentiation and maturation through p38 MAP kinase/Mitf and DC-STAMP/CtsK and TRAP pathway. *Cellular Signalling*, **2013**; 25: 1222-1227.
288. **Lacerda SA, Matuoka RI, Macedo RM, Petenusci SO, Campos AA, Brentegani LG.** Bone quality associated with daily intake of coffee: a biochemical, radiographic and histometric study. *Braz Dent J*, **2010**; 21(3): 199-204.
289. **Ojeh N, Stojadinovic O, Pastar I, Sawaya A, Yin N, Tomic-Canic M.** The effects of caffeine on wound healing. *Int Wound J*, **2014**. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/iwj.12327> (8.07.2014).
290. **Moon PD, Kim MH, Lim HS, Oh HA, Nam SY, Han NR, et al.** Taurine, a major amino acid of oyster, enhances linear bone growth in a mouse model of protein malnutrition. *BioFactors*, **2015**; 41(3): 190-7.
291. **Tian X, Zhang Z, Wang S, Diao Y, Zhao Z, Lv D.** Copper-taurine (CT): A potential organic compound to facilitate infected wound healing. *Medical Hypotheses*, **2009**; 73: 1048-1050.
292. **Ozmeric N, Ozcan G, Haytac CM, Alaaddinoğlu EE, Sargon MF.** Chitosan film enriched with an antioxidant agent, taurine, in fenestration defects. *J Biomed Mater Res*, **2000**; 51: 500-503.
293. **Choi MJ, Seo JN.** Effect of taurine feeding on bone mineral density and bone markers in rats. *Adv Exp Med Biol*, **2013**; 776: 51-58.
294. **Lorincz C, Reimer RA, Boyd SK and Zernicke RF.** High-fat. sucrose diet impairs geometrical and mechanical properties of cortical bone in mice. *The British Journal of Nutrition*, **2009**; 103(9): 1302-8.

295. Altay U, Gurgan CA, Agbaht K. Changes in inflammatory and metabolic parameters after periodontal treatment in patients with and without obesity. *J Periodontol*, **2013**; 84(1): 13-23.
296. Lundin M, Yucel-Lindberg T, Dahllöf G, Marcus C, Modéer T. Correlation between TNF alpha in gingival crevicular fluid and body mass index in obese subjects. *Acta Odontol Scand*, **2004**; 62(5): 273-7.
297. Saito T, Shimazaki Y, Kiyohara Y, Kato I, Kubo M, Iida M, Yamashita Y. Relationship between obesity, glucose tolerance, and periodontal disease in Japanese women: the Hisayama study. *J Periodontol Res*, **2005**; 40(4): 346-53.
298. Saito T, Shimazaki Y. Metabolic disorders related to obesity and periodontal disease. *Periodontol 2000*, **2007**; 43: 254-66.
299. Yudkin JS, Kumari M, Humphries SE, Mohamed-Ali V. Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis*, **2000**; 148(2): 209-14.
300. Yamaguchi N, Kukita T, Li YJ, Martinez AJG, Saito T, Hanazawa S, Yamashita Y. Adiponectin inhibits osteoclast formation stimulated by lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **2007**; 49(1): 28-34.
301. Martin A, David V, Malaval L, Lafage-Proust MH, Vico L, Thomas T. Opposite effects of leptin on bone metabolism: a dose-dependent balance related to energy intake and insulin-like growth factor-I pathway. *Endocrinology*, **2007**; 148(7): 3419-25.
302. Carvalho AAF, Nakamune ACS, Biffe BG and Louzada MJQ. High-sucrose effect on bone structure, hardness and biomechanics in an obesity model using Wistar male rats. *J Morphol Sci*, **2012**; 29(1): 32-37.
303. Tjäderhane L, Larmas M. A high sucrose diet decreases the mechanical strength of bones in growing rats. *J Nutr*, **1998**; 128(10): 1807-10.
304. Dimeglio DP and Mattes RD. Liquid versus solid carbohydrate: effects on food intake and body weight. *International Journal of Obesity*, **2000**; 24(7): 794-800.
305. Huuononen S, Tjäderhane L, Larmas M. Greater concentration of dietary sucrose decreases dentin formation and increases the area of dentinal caries in growing rats. *J. Nutr*, **1997**; 127: 2226–2230.
306. Tjäderhane L, Bäckman T, Larmas M. Effect of sucrose and xylitol diets on dentin formation and caries in rat molars. *Eur. J. Oral Sci*, **1995**; 103: 166–17.
307. Sasaki S, Yanagibori R. Association between current nutrient intakes and bone mineral density at calcaneus in pre and postmenopausal Japanese women. *J. Nutr. Sci. Vitaminol*, **2001**; 47: 289–294.
308. Masse PG, Pritzker KP, Mendes MG, Boskey AL, Weiser H. Vitamin B6 deficiency experimentally-induced bone and joint disorder: Microscopic, radiographic and biochemical evidence. *Br. J. Nutr*, **1994**; 71: 919–932.
309. Masse PG, Rimnac CM, Yamauchi M, Coburn SP, Rucker RB, Howell DS, Boskey AL. Pyridoxine deficiency affects biomechanical properties of chick tibial bone. *Bone*, **1996**; 18: 567–574.
310. Dai Z and Koh WP. B-Vitamins and Bone Health—A Review of the Current Evidence. *Nutrients*, **2015**; 7: 3322-3346.

311. **Holstein JH, Herrmann M, Splett C, Herrmann W, Garcia P, Histing T, Graeber S, et al.** Low serum folate and vitamin B-6 are associated with an altered cancellous bone structure in humans. *Am J Clin Nutr*, **2009**; 90: 1440–5.
312. **Stabler SP.** Vitamin B12 deficiency. *New England Journal of Medicine*, **2013**; 368: 2041-2042.
313. **Reynolds E.** Vitamin B12, folic acid, and the nervous system. *The Lancet Neurology*, **2006**; 5: 949–960.
314. **Vaes BLT, Lute C, Blom HJ, Bravenboer N, de Vries TJ, Everts V, et al.** Vitamin B₁₂ Deficiency Stimulates Osteoclastogenesis via Increased Homocysteine and Methylmalonic Acid. *Calcif Tissue Int*, **2009**; 84: 413-422.
315. **Sezer U, Kara MI, Erciyas K, Özdemir H, Ustun K, et al.** Protective effects of ginkgo biloba extract on ligature-induced periodontitis in rats. *Acta Odontologica Scandinavica*, **2013**; 71: 38–44.

8. ÖZGEÇMİŞ

Tuğçe PAKSOY 27.03.1986 tarihinde Aydın'da doğdu. İlk, orta ve lise öğretimini Aydın'da tamamladı. 2005 yılında girdiği Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesinden 2010 yılında mezun oldu. 2013 yılında Abant İzzet Baysal Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı'nda uzmanlık eğitimine başladı. O tarihten itibaren aynı bölümde araştırma görevlisi olarak çalışmakta ve uzmanlık eğitimine devam etmektedir.

