

**T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ**

**DENEYSEL PERİODONTİTİSLİ RATLARDA SİSTEMİK
MELATONİN UYGULAMASININ PERİODONTİTİS İLİŞKİLİ
NONALKOLİK YAĞLI KARACİĞER HASTALIĞI ÜZERİNE
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Dt. Akın Halil KOYUNCU

**Periodontoloji Ana Bilim Dalı
Uzmanlık Tezi**

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Hatice YEMENOĞLU**

RİZE-2025

**T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ PERİODONTOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL PERİODONTİTİSLİ RATLARDA SİSTEMİK
MELATONİN UYGULAMASININ PERİODONTİTİS İLİŞKİLİ
NONALKOLİK YAĞLI KARACİĞER HASTALIĞI ÜZERİNE
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Dt. Akın Halil KOYUNCU

Periodontoloji Ana Bilim Dalı

Uzmanlık Tezi

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Hatice YEMENOĞLU

RİZE-2025

KABUL ve ONAY

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Periodontoloji Ana Bilim Dalında, Doç. Dr. Hatice YEMENOĞLU danışmanlığında, Arş. Gör. Dt. Akın Halil KOYUNCU tarafından hazırlanan ‘Deneyisel periodontitisli ratlarda sistemik melatonin uygulamasının periodontitis ilişkili non alkolik yağlı karaciğer hastalığı üzerine etkilerinin incelenmesi’ adlı bu tez çalışması, 19.08.2025 tarihinde yapılan savunma sınavı sonucunda oy birliğiyle başarılı bulunarak jürimiz tarafından **Uzmanlık Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Unvanı, Adı Soyadı

Başkan

: Prof. Dr. Oğuz KÖSE

Üye

: Doç. Dr. Meltem ZİHNİ KORKMAZ

Üye

: Doç. Dr. Hatice YEMENOĞLU

ETİK BEYAN

Periodontoloji Programından mezun olmak üzere teslim ettiğim “Deneysel periodontitisli ratlarda sistemik melatonin uygulamasının periodontitis ilişkili non alkolik yağlı karaciğer hastalığı üzerine etkilerinin incelenmesi” adlı tezim, bilim ve araştırma etiği prensiplerine riayet edilerek tarafımdan yazılmıştır.

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

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

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

Akın Halil KOYUNCU

19.08.2025

TEŞEKKÜR

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

Uzmanlık eğitimim süresince kliniğimizde bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım değerli hocalarım Prof. Dr. Oğuz KÖSE, Doç. Dr. Meltem ZİHNİ KORKMAZ, Dr. Öğr. Üyesi Semih Alperen BOSTAN ve Dr. Öğr. Üyesi Hatice YEMENOĞLU'na,

Tez kapsamında gerçekleştirilen biyokimyasal çalışmalar için Prof. Dr. Adnan YILMAZ ve Öğr. Gör. Dr. Sibel Mataracı KARAKAŞ'a, histolojik çalışmalar için Doç. Dr. Tolga MERCANTEPE'ye,

Fakültede tanıdığım uzmanlık sürecimde yanımda olan eş kıdemlilerime, uyumla çalıştığım asistan arkadaşlarıma periodontoloji bölümü personellerine,

Buraya gelmemde büyük emekleri olan kıymetli aileme

Teşekkür ederim.

Bu çalışma Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü birimince desteklenmiştir. Proje Numarası: TSA-2025-1992 (This work was supported by the Research Fund of Recep Tayyip Erdoğan University. Project Number: TSA-2025-1992).

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	I
TEŞEKKÜR.....	II
ÖZET	VI
ABSTRACT	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	2
TABLolar DİZİNİ	3
1.GİRİŞ.....	4
2. GENEL BİLGİLER.....	6
2.1. Periodontal Hastalıklar	6
2.1.1. Periodontal Hastalıkların Sınıflandırılması.....	7
2.1.2. Periodontal Sağlık	8
2.1.3 Mikrobiyal Dental Plak ile İlişkili Gingivitis	9
2.1.4. Mikrobiyal Dental Plak ile İlişkili Olmayan Gingivitis.....	10
2.1.5. Periodontitis	10
2.1.3. Periodontitis Patogenezi.....	17
2.1.4. Periodontal İnflamasyon	20
2.1.5. Periodontitis Patogenezinde Rol Oynayan Sitokinler	22
2.2. Oksidan ve Antioksidan Sistem	25
2.2.1 Reaktif Oksijen Türlerinin Periodontitis Patogenezindeki Rolü.....	26
2.2.2 Toplam Antioksidan Seviye, Toplam Oksidan Seviye ve Oksidatif Stres İndeksi.....	27
2.2.3. Malondialdehit	28
2.2.4. Glutasyon.....	29
2.3. Karaciğer	29
2.3.1. Non Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı ve Non Alkolik Steatohepatitin Tanımı, Yaygınlığı ve Epidemiyolojisi.....	31
2.3.2. Non Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı ve Non Alkolik Steatohepatitin Etiyolojisi ve Patofizyolojisi	32
2.4. Periodontitis ve NAYKH	36

2.5. Melatonin	40
2.5.1. Melatoninin Etki Mekanizmaları ve Fizyolojik Önemi	40
2.5.2. Melatoninin Anti-inflamatuar Etkisi	41
2.5.3. Melatonin Kemik Metabolizması İlişkisi.....	42
2.5.4. Melatonin ve Antioksidan Etkisi.....	43
2.5.5. Melatonin ve Antimikrobiyal Etkisi	44
2.5.6. Melatonin ve Periodontitis	45
2.5.7. Melatonin ve NAYKH	47
2.5.8. Periodontitis, NAYKH ve Melatonin Arasındaki İlişki.....	48
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	49
3.1. Deney Hayvanlarının Temin Edilmesi ve Barınması.....	50
3.2. Ligatür ile Periodontitis İndüksiyonu	52
3.3. Melatonin Uygulanması.....	53
3.4. Örneklerin Toplanması ve Hazırlanması.....	54
3.5. Radyomorfometrik Analizler	55
3.6. Biyokimyasal Analizler	56
3.6.1. Analizlerde Kullanılan Araç Gereçler.....	56
3.6.2. Analizlerde Kullanılan Kimyasallar, Kitler ve Markaları.....	58
3.6.3. Doku ve Kan Örneklerinin Toplanması	59
3.6.3.1. Doku Örneklerinin Toplanması.....	59
3.6.3.2. Kan Örneklerinin Toplanması.....	59
3.6.4. Karaciğer Dokularının Homojenizasyonu	59
3.6.4.1 TBARS Tayini.....	60
3.6.4.2 Toplam Tiyo (TT) Gruplarının Tayini	62
3.6.4.3. Doku IL-6, IL-1 β , Leptin, Adiponektin ve TNF- α Düzeylerinin Belirlenmesi	63
3.6.4.4. Toplam Antioksidan Seviye (TAS) ve Toplam Oksidan Seviye (TOS) Tayini	73
3.7. Histopatolojik Analiz	74
3.8. İmmunohistokimyasal Analiz	75
4. BULGULAR.....	80
4.1. Antropometrik Bulgular.....	80
4.2. Morfometrik Bulgular (Alveoler Kemik).....	80
4.3. Histopatolojik Bulgular	82

4.4. İmmunohistokimyasal Bulgular	86
4.5. Biyokimyasal Bulgular.....	94
4.5.1. Doku Pro-inflamatuar ve Anti-inflamatuar Sitokin Bulguları	94
4.5.1.1. Doku IL-1 β , IL-6 ve IL-10 Bulguları	94
4.5.2. Doku Oksidan-Antioksidan Parametrelerin Bulguları.....	95
4.5.2.1. Doku Malondialdehit ve Glutasyon Bulguları	95
4.5.2.2. Doku TAS, TOS ve OSİ Bulguları.....	95
4.5.2.3. Doku Adiponektin ve Leptin Bulguları	95
4.5.2.4. Serum AST, ALT, Total kolesterol ve HDL Bulguları	96
5. TARTIŞMA.....	97
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	109
KAYNAKLAR	111
EKLER	129
EK-1 ÖZGEÇMİŞ	129
EK-2 ETİK ONAY FORMU	130

ÖZET

Deneyisel Periodontitisli Ratlarda Sistemik Melatonin Uygulamasının Periodontitis İlişkili Non Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

Amaç: Deneyisel periodontitis ve non alkolik yağlı karaciğer hastalığı oluşturulmuş ratlarda, periodontitisin karaciğer dokusu üzerine olası etkilerinin ve sistemik olarak uygulanan melatoninin tedavi edici etkinliğinin araştırılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: 48 dişi Sprague-Dawley rat rastgele altı gruba ayrıldı: Kontrol, Non alkolik yağlı karaciğer (NAYK), deneyisel periodontitis (Dp), NAYK+Dp, NAYK+Melatonin (Mel), NAYK+Dp+Mel. 9 hafta boyunca yüksek yağlı yüksek kolesterolü (HFHC) diyetle beslenen ratlarda NAYK modeli oluşturuldu. Ardından periodontitis, sağ-sol alt 1. molar dişlerin boyunlarına sub-paramarjinal pozisyonda 4.0 ipek sütur yerleştirilmesi ve süturun yerinde 5 hafta süre ile muhafazası yoluyla indüklendi. Periodontitis oluşturulması sonrası intraperitoneal olarak melatonin ve taşıyıcı (Kontrol ve Dp grupları) uygulamaları (10 mg/vücut ağırlığı/gün, 14 gün) gerçekleştirildi. Ratların alt çene ve karaciğer doku örnekleri alındı. Alveoler kemik kaybı mikrobilgisayarlı tomografik kesitlerle ölçüldü. Mandibulada immunohistokimyasal (RANKL, OPG, TGF- β), karaciğerde histopatolojik ve immünohistokimyasal (kaspaz-3), biyokimyasal (MDA, GSH, OSİ, TNF- α , IL-1 β , IL-6, leptin, adiponektin, toplam kolesterol, HDL, ALT, AST) değerlendirmeler yapıldı.

Bulgular: Bulgularımıza göre, en fazla vücut ağırlığı NAYK+Dp+Mel grubunda, en fazla karaciğer ağırlığı ise NAYK+Dp grubunda bulundu ($p<0.05$). Alveolar kemik kaybı en fazla NAYK+Dp grubunda gözlemlendi ve melatonin uygulaması bu kaybı azalttı. Histopatolojik bulgulara bakıldığında, Dp, NAYK ve NAYK+Dp gruplarında belirgin nekroz, inflamasyon ve vasküler konjesyon izlenirken, melatonin uygulaması bu bulgularda iyileşme sağladı. En yüksek LHDS skorları NAYK+Dp grubundaydı. Kaspaz-3 pozitif hepatositler NAYK, Dp ve NAYK+Dp gruplarında artmış, melatonin uygulaması sonucu azaldı. Alveoler kemikte RANKL, OPG ve TGF- β ekspresyonu NAYK+Dp grubunda artış gösterdi ve melatonin uygulaması sonucu azaldı. Biyokimyasal incelemeler sonucunda, TNF- α değeri, NAYK, Dp ve NAYK+Dp gruplarında, diğer gruplara göre anlamlı şekilde yüksekti. IL-6 seviyesi, kontrol ve NAYK+Dp+Mel gruplarında diğer gruplara göre anlamlı şekilde düşüktü. AST düzeyleri NAYK ile NAYK+Dp gruplarında diğer gruplara göre yüksekti ve melatonin uygulaması ile anlamlı şekilde azaldı.

Sonuç: Melatonin periodontitis ilişkili non alkolik yağlı karaciğer hastalığında inflamatuvar stres, apoptozis gibi bozuklukları etkili bir şekilde sınırlandırabilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Karaciğer, deneyisel periodontitis, non alkolik yağlı karaciğer hastalığı, melatonin, oksidatif stres

ABSTRACT

Investigation of the Effects of Systemic Melatonin Administration on Periodontitis-Associated Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Rats with Experimental Periodontitis

Aim: The aim was to investigate the possible effects of periodontitis on liver tissue and the therapeutic efficacy of systemically administered melatonin in non-alcoholic liver disease patients with experimental periodontitis.

Material and Methods: 48 female Sprague-Dawley rats were randomly divided into six groups: control, Non-Alcoholic Fatty Liver (NAFLD), experimental periodontitis (Ep), NAFLD + Ep, NAFLD + Melatonin (Mel), and NAFLD + Ep + Mel. A NAFLD model was established in rats fed a high-fat, high-cholesterol (HFHC) diet for 9 weeks. Periodontitis was then induced by placing 4.0 silk suture in the subparamarginal position across the necks of the right and left mandibular first molars and maintaining the suture in place for 5 weeks. Following the induction of periodontitis, melatonin and vehicle (Control and Ep groups) were administered intraperitoneally (10 mg/body weight/day, 14 days). Tissue samples from the rats' lower jaw and liver were collected. Alveolar bone loss was measured using microcomputed tomographic sections. Immunohistochemical (RANKL, OPG, TGF- β) on the mandible, histopathological, immunohistochemical (caspase-3), and biochemical (MDA, GSH, OSI, TNF- α , IL-1 β , IL-6, leptin, adiponectin, total cholesterol, HDL, ALT, AST) were evaluated on the liver.

Results: According to our findings, the highest body weight was found in the NAFLD+Dp+Mel group, and the highest liver weight was found in the NAFLD+Dp group ($p < 0.05$). Alveolar bone loss was greatest in the NAFLD+Dp group, and melatonin administration reduced this loss. Histopathological findings revealed significant necrosis, inflammation, and vascular congestion in the Dp, NAFLD, and NAFLD+Dp groups, while melatonin administration improved these findings. The highest LHDS scores were in the NAFLD+Dp group. Caspase-3-positive hepatocytes increased in the NAFLD, Dp, and NAFLD+Dp groups, but decreased following melatonin administration. RANKL, OPG, and TGF- β expression in alveolar bone increased in the NAFLD+Dp group and decreased following melatonin administration. Biochemical analyses revealed that TNF- α levels were significantly higher in the NAFLD, Dp, and NAFLD+Dp groups compared to the other groups. IL-6 levels were significantly lower in the control and NAFLD+Dp+Mel groups compared to the other groups. AST levels were higher in the NAFLD and NAFLD+Dp groups compared to the other groups and significantly decreased with melatonin administration.

Conclusion: Melatonin can effectively limit disorders such as inflammatory stress and apoptosis in periodontitis-associated non-alcoholic fatty liver disease.

Keywords: Liver, experimental periodontitis, non-alcoholic fatty liver disease, melatonin, oxidative stress

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrat derece
μA	: Mikroamper
μl	: Mikrolitre
μm	: Mikrometre
μm²	: Mikrometrekare
μmol	: Mikromol
8-OHdG	: 8-hidroksideoksi-guanozin
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
Agt	: Anjiyotensinojen
ANOVA	: Varyans analizi
Apaf-1	: Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1
B	: Bukkal
Bax	: Bcl-2 ile ilişkili x proteini
CCl₄	: Karbon tetraklorür
cm³	: Santimetreküp
CRP	: C reaktif proteini
CT	: Computed tomography
KtD	: Katepsin D
D	: Distal
DF	: Distal furkasyon

dk	: Dakika
dl	: Desilitre
DM	: Diabetes mellitus
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DOS	: Dişeti oluğu sıvısı
Dp	: Deneysel periodontitis
Dp-Mel	: Deneysel periodontitis-melatonin
DTNB	: 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoik asit
ELISA:	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
g	: Santrifüj kuvveti
GFH	: Glomerüler filtrasyon hızı
Gİ	: Gingival indeks
GnRH	: Gonadotropin salgılatıcı hormon
gr	: Gram
GSH	: Glutasyon
H&E	: Hematoksilen-Eozin
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
ICAM-1	: Hücreler arası adezyon molekülü-1
IL-1	: İnterlökin-1
IL-1β	: İnterlökin-1 beta
IL-6	: İnterlökin-6
IL-8	: İnterlökin-8
INF-γ	: İnterferon gama

KAK	: Klinik ataşman kaybı
Kaspaz	: Sistein aspartat spesifik proteaz
KAT	: Katalaz
kcal	: Kilokalori
kg	: Kilogram
KK	: Kemik kreti
kV	: Kilovolt
L	: Lingual
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
LPS	: Lipopolisakkarit
M	: Molar
MDA	: Malondialdehit
MDP	: Mikrobiyal dental plak
MF	: Meziyal furkasyon
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
MSB	: Mine sement birleşimi
MT	: Melatonin reseptörü

NaCl	: Sodyum klorür
NF-kβ	: Nükleer faktör kappa beta
ng	: Nanogram
NK	: Doğal öldürücü hücreler
nm	: Nanometre
nmol	: Nanomol
O₂	: Tekli oksijen
O₂⁻	: Süperoksit radikali
OD	: Optik yoğunluk
OH⁻	: Hidroksil radikali
OPG	: Osteoprotegerin
OSİ	: Oksidatif stres indeksi
PBS	: Fosfat tamponlu salin
pg	: Pikogram
Ph	: Power of hydrogen
PiMK	: Patojenle ilişkili moleküler kalıplar
RANK	: Reseptör aktivatör nükleer faktör kappa B
RANKL	: Reseptör aktivatör nükleer faktör kappa B ligandı
RAS	: Renin anjiyotensin sistem
ROT	: Reaktif oksijen türleri
rpm	: Dakikada dönme sayısı
RTEÜ	: Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi

sn	: Saniye
SOD	: Süperoksit dismutaz
SSPS:	: İstatistiksel Analiz Yazılımı
TAOK	: Total antioksidan kapasite
TBA	: Tiyobarbitürik asit
TCA	: Tiyokarboksilik asit
TEP	: 1,1,3,3 tetrametahidroksi propan
Th1	: T helper 1
TIMP	: Matrix metalloproteinaz doku inhibitörü
TLR	: Toll-like reseptör
TNF-α	: Tümör nekrozis faktör-alfa
TOS	: Toplam oksidan seviye
VCAM	: Vasküler hücre adezyon molekülü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1 Periodontitis Modeli Oluşturulması	53
Şekil 3.2. MSB ve AKK arasındaki mesafenin radyografik ölçümü	56
Şekil 3.3 Karaciğer Dokuların Homojenizasyonu	60
Şekil 3.4. TBARS standart grafiği	62
Şekil 3.5. TT standart grafiği	63
Şekil 3.6. Standartların hazırlanması	64
Şekil 3.7. Kit ve numunelerin oda sıcaklığına getirilmesi	65
Şekil 3.8. Biotinylated Detection Ab çalışma çözeltisi ekleme aşaması	67
Şekil 3.9. ELISA BioTek EL×50 otomatik yıkayıcı ile yıkama aşaması	67
Şekil 3.10. HRP Konjugat ekleme aşaması	68
Şekil 3.11. Stop solüsyon ekleme aşaması (renk maviden sarıya döner)	68
Şekil 3.12. Thermo Scientific, Multiskan GO cihazında mikropłakanın okunması, standart grafiklerin çizimi ve sonuçların hesaplanması	69
Şekil 3.13 Adiponektin standart grafiği	70
Şekil 3.14. Leptin standart grafiği	70
Şekil 3.15. IL-1 β standart grafiği	71
Şekil 3.16. IL-6 standart grafiği	72
Şekil 3.17. TNF- α standart grafiği	72
Şekil 4.1. Mandibular 1.molar dişlerin periodontal kemik kayıplarının bukkolingual ve meziyodistal kesitlerde gösterimi	82
Şekil 4.2. Harris Hematoksilen ve Eozin G ile boyanan karaciğer dokusuna ait kesitlerin temsili ışık mikroskopik resimleri.	85
Şekil 4.3. Caspase-3 primer antikoru ile inkübe edilen karaciğer dokusuna ait kesitlerin temsili ışık mikroskobu görüntüleri	88
Şekil 4.4. Peridontitis modeli uygulanmış sıçanların TGF- β primer antikoru ile inkübe edilen çene dokusuna ait kesitlerin temsili ışık mikroskopik görüntüleri	91
Şekil 4.5. Peridontitis modeli uygulanmış sıçanların RANKL primer antikoru ile inkübe edilen çene dokusuna ait kesitlerin temsili ışık mikroskobu görüntüleri	92
Şekil 4.6. Peridontitis modeli uygulanmış sıçanların OPG primer antikoru ile inkübe edilen çene dokusuna ait kesitlerin temsili ışık mikroskobu görüntüleri	93

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Periodontitisin Evreleri	15
Tablo 2.2. Periodontitisin Dereceleri	17
Tablo 3.1. Diyet Modeli Standart pellet rat yemi (270 kcal / 100 gr, Bayramoğlu Yem, Erzurum, Türkiye)	50
Tablo 3.2. NAYK yemi	50
Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan cihazlar ve markaları	57
Tablo 3.4 Çalışmada kullanılan kimyasallar markaları.....	58
Tablo 3.5. Karaciğer Histopatolojik Skoru (LHDS)	77
Tablo 3.6. Semi Kantitatif Analiz (İmmün Pozitiflik Skoru).....	78
Tablo 3.7. İmmün-Pozitivite Skorlaması	79
Tablo 4.1. Antropometrik Bulgular.....	80
Tablo 4.2. Alveolar kemik kayıplarının gruplararası karşılaştırılması	81
Tablo 4.3. Histopatolojik bulguların karşılaştırılması.....	84
Tablo 4.4. Semi Kantitatif Analiz Sonuçları (Karaciğer)	87
Tablo 4.5. Semi-Kantitatif Analiz Sonuçları (Alveoler Kemik)	90
Tablo 4.6. Biyokimyasal bulguların gruplararası karşılaştırılması	94

1.GİRİŞ

Periodontitis, periodonsiyumun yıkımı ile karakterize olan ve ilerleyen evrelerinde diş kayıplarına yol açabilen kronik bir inflamatuvar hastalıktır.^{1,2} Ancak günümüzde, periodontitisin yalnızca ağız sağlığını tehdit eden lokal etkili bir hastalık olmadığı, diş prognozunun ötesinde sistemik sağlık üzerinde de belirgin olumsuz etkiler oluşturabileceğine dair güçlü kanıtlar bulunmaktadır.^{3,4}

Periodontal kaynaklı bakteriler ve bu mikroorganizmaların virülans faktörleri; doğrudan kan dolaşımına katılarak veya çeşitli inflamatuvar mediyatörlerin salınımını tetikleyerek dolaylı yoldan sistemik immün-inflamatuvar yanıtı aktive etmektedir.³

Periodontitis ile ilişkili olan bu düşük dereceli kronik sistemik inflamasyon, başta akut ve kronik kardiyovasküler hastalıklar, diabetes mellitus (DM), romatoid artrit ve gebelik ile ilişkili komplikasyonlar olmak üzere birçok sistemik hastalık ve durum üzerinde olumsuz etkilere yol açabilmektedir.^{3,4}

Tıbbi periodontoloji ile ilgili araştırma alanında bugüne kadar çok az sayıda makale periodontal hastalık ile sindirim sistemi organları arasındaki ilişkiyi ele almıştır. Mevcut literatüre bakıldığında periodontal hastalık ile non alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAYKH) arasındaki ilişki son yıllarda güncel ve trend bir çalışma alanı olmuştur.⁵⁻¹² Düşük seviyeli inflamasyon oksidatif stresi artırmaktadır. Güncel veriler periodontal inflamatuvar stresin çeşitli düzeylerde karaciğer fonksiyon bozukluklarına neden olarak NAYKH riskini arttırdığını göstermektedir.^{6,11,13,14} Tüm bu kanıtlar,

inflatuar ve oksidatif stres koşullarından yapısal ve fonksiyonel düzeyde etkilenen karaciğerin korunmasında, immünmodölatör ve antioksidan özelliklere sahip ajanların potansiyel yararlar sağlayabileceğini göstermektedir.^{10,13,14}

Karaciğer, hepatositlerde oksidatif strese yol açabilen çok sayıda reaktif oksijen türünü (ROT) detoksifiye etmede ana rolü oynar. Çünkü şiddetli oksidatif hasar karaciğer fonksiyonunu bozar. Son araştırmalar, karaciğeri hasardan koruyan ve hidroksil radikalini temizleyen güçlü bir endojen antioksidan görevi gören melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin) rolünü doğrulamıştır.¹⁵ Melatoninin konak modöstasyon ajanı olarak; kardiyovasküler hastalıklar, DM ve periodontitis gibi inflamatuvar kökenli birçok hastalığın tedavisindeki rolü, güncel araştırmaların odak noktalarından biridir.^{16,17}

Bu deneysel periodontitis çalışması, NAYKH varlığında, sistemik melatonin uygulamasının antioksidan, antiinflamatuvar ve anti rezorptif etkileri yoluyla, periodontitisin karaciğer dokusu üzerine olumsuz etkilerini iyileştirebileceği hipotezi temelinde planlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Periodontal Hastalıklar

Periodontitis, diş destek dokularının ilerleyici yıkımına, mobiliteye ve diş kaybına yol açabilen yaygın, karmaşık, kronik inflamatuvar bir hastalıktır. Plak biyofilminin esas mikrobiyal bileşimi, gram-pozitif aerobik bakterilerden oluşur ve bir denge durumundadır. Bununla birlikte, periodontitise ilerleyen süreç, esas olarak gram negatif anaerobik ve disbiyotik mikrobiyal biyofilmden oluşan topluluk yapısında dramatik bir değişim ile ilişkilidir.¹⁸ Periodontal hastalığın yıkıcı formlarının gelişiminde rol oynayan bu disbiyotik mikrobiyal biyofilmin içeriğindeki bazı periodontopatojenler arasında *Porphyromonas gingivalis* (P. gingivalis), *Treponema denticola* (T. denticola) ve *Tannerella forsythia* (T. forsythia) yer almaktadır.¹⁹ Bu patojenik bakteriler periodontal inflamasyonu başlatır ve sürdürür. Patojenik bakterilerin periodontal patogenezdaki birincil önemleri, doku hasarına neden olan yıkımın ana belirleyicisi olan konakçının immüninflamatuvar yanıtını aktive etmesidir. Bu durum duyarlı kişilerde subgingival mikrobiyota ile konak savunması arasındaki dengenin bozulmasına, ardından polimikrobiyal enfeksiyonla sonuçlanmasına neden olur.^{20,21} İltihaplı periodontal dokulardan gelen ürünler de dolaşıma girerek çeşitli yollardan sistemik hastalıklara duyarlılığı artırır.

Gingivitis, diş eti dokularının inflamatuvar yanıtıdır.²² Klinik olarak diş etinde hiperemi ve ödem bulunmakla beraber, alveoler kemikte ve epitelyal atışmada kayıp bulunmamaktadır.²³ Başlangıçta mikrobiyal dental plak (MDP)'ye cevap olarak oluşan

gingivitis, tedavi edilmediği takdirde periodontitise dönüşebilir. Periodontal doku yıkımı, MDP'deki patojenik bakterilerin virölans faktörleri ile buna cevap olarak gelişen konağın immunoinflamatuar cevabı arasındaki etkileşimlerin bir sonucu olarak meydana gelir.²⁴ Periodontitis genellikle yetişkinlerde görülür ancak çocuklarda ve ergenlerde de görülebilir.²⁴ Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün 2023 yılında yayınladığı rehberde, şiddetli periodontal hastalıkların, dünya çapında 1 milyardan fazla vakayı temsil ettiği, küresel yetişkin nüfusun yaklaşık %19'unu etkilediği bildirilmiştir.²⁵ Periodontal hastalık en karmaşık, kronik ve bulaşıcı olmayan hastalıklar arasında yer aldığından, her yeni hasta için tanımlanması gereken bir dizi risk faktörü vardır.²⁶

2.1.1. Periodontal Hastalıkların Sınıflandırılması

Periodontal hastalıklar farklı şekillerde sınıflandırılmakla beraber Uluslararası Periodontoloji Çalıştayı'nda 1999 yılında kabul edilen sınıflama²⁷ Avrupa Periodontoloji Federasyonu ve Amerikan Periodontoloji Akademisi katkılarıyla 2017 yılında değiştirilerek yenilenmiştir. Yenilenen bu periodontal sınıflandırma; periodontal sağlık, diş eti hastalıkları ve durumları, periodontitis ve periodonsiyumu etkileyen diğer durumlar olmak üzere üç ana başlık altında toplanır. Periodontitisin sınıflandırılması ise hastalığın patofizyolojik mekanizmasına uygun olarak 3 başlık altında incelenir. Bunlar; periodontitis (1999 yılında kabul edilen eski sınıflamadaki agresif ve kronik formlar kaldırılıp tek çatı altında toplanmıştır), nekrotizan periodontitis ve sistemik hastalıkların belirtisi olarak periodontitis şeklindedir (Tablo 2.1.).²⁸

2017 Dünya Periodontoloji Çalıştayı'na göre periodontitisin tanımı;

- Komşu olmayan 2 veya daha fazla dişte interdental ataşman kaybının olması veya,
- 2 veya daha fazla dişte 3 mm'den fazla sondalanan cep derinliği (SCD) gözlenmesiyle birlikte

Bukkal veya /lingual – palatinal yüzeyde klinik ataşman kaybının (KAK) 3 mm veya daha fazla olması şeklinde tanımlanmıştır.²⁹

Fakat üçüncü büyük azı dişlerin malpozisyonuna bağlı olarak gelişen ikinci büyük azıların distalindeki KAK, vertikal kök fraktürlerine bağlı oluşan KAK, marjinal periodonsiyumdan drene olan endodontik lezyonlar, dişin servikal hattına ya da apikaline uzanan çürükler ve travma kaynaklı diş eti çekilmeleri periodontitis teşhisi tanımlaması içinde geçerli olmamaktadır.³⁰

Periodontitisin klinik bulguları arasında supra ve subgingival plak/diştaşı birikimi, periodontal cep oluşması, ataşman kaybı, diş etinde inflamatuvar değişiklikler (ödem, eritem, sondalamada kanama vb.), sondalamada diş eti dokusunda direncin azalması ve alveolar kemik rezorbsiyonu sayılabilir. Periodontal dokuların kaybıyla birlikte dişlerde süpürasyon, mobilite ve açığa çıkmış kök yüzeyleri görülebilmektedir. Hastalık genellikle sessiz ve ağrısız ilerlemekle birlikte, diş eti çekilmelerine bağlı olarak sıcağa ve soğuğa karşı hassasiyet olabilmektedir.³¹

2.1.2. Periodontal Sağlık

Periodontal sağlık, bireyin herhangi bir periodontal hastalık geçirmemesi ya da daha önce periodonsiyumda yapısal zarara yol açabilecek bir periodontal hastalık öyküsünün bulunmaması olarak tanımlanmaktadır.³²

Literatürde periodontal sağlığı tanımlamak üzere iki farklı kavramdan söz edilmektedir. Bunlardan ilki, "bozulmamış klinik sağlık" terimidir. Bu durum; klinik olarak ataşman kaybının ve sondalama sırasında kanamanın olmadığı, sondalanan cep derinliğinin maksimum 3 mm olduğu, ayrıca eritem, ödem veya püy gibi inflamasyon bulgularının gözlenmediği bir durumu ifade eder. Histolojik açıdan da periodonsiyumda

inflamasyona dair herhangi bir belirti bulunmaz. Ancak bozulmamış klinik sağlık durumu pratikte oldukça nadir gözlemlenmektedir.

Bu nedenle daha sık karşılaşılan durum, "klinik sağlık" olarak adlandırılır. Klinik sağlık; anatomik olarak sağlam ya da kayba uğramış periodonsiyumda, klinik olarak belirgin periodontal inflamasyon bulgularının bulunmaması ya da minimal düzeyde olması; ayrıca diş eti oluğu sıvısında (DOS) inflamatuvar belirteçlerin saptanmaması veya çok düşük düzeylerde bulunması olarak kabul edilmektedir.³³

Azalmış periodonsiyuma sahip bireylerde gingival sağlık durumu, "stabil periodontitis" ve "non-periodontitis" olmak üzere iki alt grupta sınıflandırılmaktadır. Stabil periodontitis, daha önce periodontitis tanısı almış ve tedavi edilmiş bireylerde, sondalama sırasında kanama, eritem, ödem ve derin periodontal ceplerin bulunmamasına rağmen ataşman kaybı ve alveol kemik kaybının mevcut olduğu klinik durumu tanımlar.

Buna karşın non-periodontitis, diş eti çekilmesi görülen ya da kron boyu uzatma gibi periodontal cerrahi işlemler uygulanmış ancak önceden periodontitis geçirmemiş bireylerdeki azalmış periodonsiyum varlığını ifade eder.³²

Azalmış periodonsiyumlu hastalarda, geçmişte yaşanmış periodontal hastalıklara bağlı olarak alveolar kemikte yıkım söz konusu olabileceğinden, radyografik değerlendirme tanı açısından kritik öneme sahiptir. Ancak bu hasta grubunda yalnızca radyolojik bulgulara dayanarak periodontal sağlık durumu hakkında kesin yargıya varılmamalı; klinik muayene bulguları ile birlikte çok yönlü bir değerlendirme yapılmalıdır.³³

2.1.3 Mikrobiyal Dental Plak ile İlişkili Gingivitis

Gingivitis, diş etinde çeşitli düzeylerde eritem ve ödemin yanı sıra sondalama sırasında veya spontan olarak ortaya çıkan kanamalar, DOS'ta artış ile karakterize edilen, radyografik olarak kemik kaybının izlenmediği bir periodontal hastalıktır.

Hastalığın ilk klinik bulguları genellikle sondalamada kanama ve DOS miktarında artış şeklinde gözlenir.³⁴ Enflamasyon bulguları serbest ve yapışık diş etiyle sınırlıdır, mukogingival hattın ötesine geçmez.³⁵

Her ne kadar gingivitis doğrudan diş kayıplarına neden olmasa da, periodontitise ilerleyebileceği göz önünde bulundurularak erken tanı ve tedavi büyük önem taşır.³⁶ Uygun plak kontrolü sağlandığında ve oral hijyene dikkat edildiğinde gingivitisin geri dönüşümlü olduğu bilinmektedir.³⁷ Bu nedenle, gingivitis tedavisinde temel yaklaşım, etkin bir plak kontrolü ile hastaların oral hijyen davranışlarının iyileştirilmesini sağlamaktır.³⁸

2.1.4. Mikrobiyal Dental Plak ile İlişkili Olmayan Gingivitis

Biyofilmden bağımsız gingival hastalıklar, dental plak ile ilişkili olmayan ve çoğu zaman plağın uzaklaştırılması sonrasında da klinik tablonun iyileşmediği durumları kapsamaktadır.

Bu grup hastalıklar arasında; bakteriyel, viral ve fungal enfeksiyonlar, genetik kökenli hastalıklar, travmatik lezyonlar, fiziksel, kimyasal ya da termal yaralanmalar, gingival pigmentasyon, kontakt alerjik reaksiyonlar, mukokutanöz hastalıklar, diş etlerinde gözlenen maligniteler ve C vitamini eksikliği gibi lokal ya da sistemik etiyolojiye sahip durumlar yer almaktadır.³²

2.1.5. Periodontitis

Periodontitis, mikrobiyal dental plak ile ilişkili olarak gelişen, periodontal ataşman kaybına yol açan ve ileri evrelerde periodontal desteğin zayıflamasıyla birlikte diş kaybı ile sonuçlanabilen, kronik ve multifaktöriyel bir inflamatuvar hastalıktır.³⁶

Bu hastalık, geri dönüşü olmayan doku yıkımı ile karakterizedir. Patofizyolojik süreçte, doku yıkımına neden olan konak kaynaklı proteinazların aktivasyonu kritik bir rol oynamaktadır. Bu yıkım süreci sonucunda, bağlantı epitelinde apikale doğru bir göç meydana gelir ve bakteriyel biyofilmin daha derin dokulara ilerleyerek apikal bölgede kolonize olması, hastalığın ilerlemesine zemin hazırlar.

Periodontitis Evreleme ve Derecelendirme Sistemi

2017 yılında yapılan sınıflandırmada periodontitis, agresif ve kronik periodontitis olarak ayrılmayıp tek başlık altında toplanmıştır. Bununla beraber yeni sınıflamaya göre periodontitis, evreleme ve derecelendirme sistemiyle incelenmeye başlanmıştır. Evreleme sisteminde periodontitisin yayılımı, şiddeti ve uzun dönemde estetik ve fonksiyon sağlayacak olan tedavinin kompleksliği incelenir.²⁹ Derecelendirmede ise periodontitisin gelişimi, tedaviye verilecek yanıt ve hastanın kontrol seanslarının sıklığı belirlenmek amacıyla hastanın genel sağlığı değerlendirilir ve diyabet, sigara kullanımı gibi risk faktörleri göz önünde tutulmaktadır.^{29,39,40} Derecelendirme hastanın risk değerlendirmesine imkan sağlamaktadır. Evreleme 4 kategori (I, II, III ve IV), derecelendirme ise 3 kategori (A, B ve C) altında incelenmektedir.²⁹

Evre I Periodontitis

Gingivitisten periodontitise geçilen ilk aşamadır ve ataşman kaybının erken safhasıdır. Evre I periodontitis, bozulmuş mikrobiyota ve uzun süre devam eden diş eti inflamasyonuna karşı vücudun verdiği yanıt olarak meydana gelmektedir. Hastalığın erken teşhisinde geleneksel mekanik yöntemler, oral hijyen prosedürleri uygulanarak

idame sağlanabilir. Diş hekimliğinde hastalığı erken teşhis etmek zordur. Bunun nedeni periodontitis teşhisinde altın standart olarak kabul edilen periodontal sondalamanın yanı sıra erken klinik ataşman kaybını belirlemede yetersiz kalabilmesidir. Bu nedenle periodontal sondalamanın yanı sıra tükürük biyobelirteçlerinin değerlendirilmesinin veya yeni görüntüleme tekniklerinin evre I periodontitisin erken teşhis edilmesinde faydalı olabileceği düşünölmektedir.²⁹

Evre I periodontitis hastalarında;

- İnterdental alanda klinik ataşman kaybı (KAK) 1-2 mm olup sondalanabilen cep derinliği (SCD) derinliği en fazla 4mm'dir.
- Koronal üçlüde %15'i geçmeyen radyografik kemik kaybı (RKK) vardır ve genellikle horizontaldir.
- Periodontitis sebebiyle kaybedilmiş diş yoktur.²⁹

Evre II Periodontitis

Yerleşik periodontitisi temsil eder. Uygun klinik periodontal inceleme sonucuyla periodontal dokulardaki ilerleyen kayıp gösterilir. Birçok vakada, standart tedavi prensiplerinin uygulanması ve hastanın düzenli profesyonel ağız bakımını gerçekleştirmesi ile hastalığın ilerlemesini durdurmak mümkündür. Tedaviye verilen yanıt dikkatle değerlendirilmelidir. Hastanın tedaviye verdiği yanıtla birlikte hastalığın derecesi daha yoğun tedavi gereksinimi gerektirebilmektedir.²⁹

Evre II periodontitis hastalarında;

- İnterdental alanda KAK 3-4 mm ve SCD en fazla 5mm'dir.
- Koronal üçlüde %15-33 arasında RKK vardır ve genellikle horizontaldir.

- Periodontitis sebebiyle kaybedilmiş diş yoktur.²⁹

Evre III Periodontitis

Periodontal ataşmanın ciddi hasar aldığı evredir. Kapsamlı periodontal tedavi yapılmadığında diş kayıpları görülebilir. Bu evre kökün orta ve apikal üçlüsüne kadar ilerleyen periodontal yıkımlarla karakterizedir. Tedaviyi zorlaştıran furkasyon tutulumu, periodontal kaynaklı diş kaybı hikayesi, derin kemik içi defektler ve ilerleyen aşamalarda implant cerrahisini zorlaştıracak çıkıntılı alveolar kemik defektleri mevcut olabilmektedir. Bununla beraber çiğneme fonksiyonu korunmaktadır.

Evre III periodontitis hastalarında;

- İnterdental KAK 5 mm veya daha fazladır.
- Radyografik olarak kökün orta veya apikal üçlüsüne uzanan kemik kayıpları görülür.
- Orta seviyede alveolar kret defektleri mevcuttur.
- Periodontal sebeplerle kaybedilen diş sayısı en fazla 4'tür.
- SCD en az 6 mm, vertikal kemik kaybı en az 3 mm'dir.
- Sınıf II veya sınıf III furkasyon defektleri görülebilir.
- Diş kaybı görülebilmesine rağmen, çiğneme fonksiyonu korunur ve fonksiyonu düzeltmek için karmaşık tedavilere henüz ihtiyaç yoktur.²⁹

Evre IV Periodontitis

Periodonsiyumda ilerleyen hasarla beraber ciddi anlamda artan periodontal yıkımlardan bahsedilebilir. İlerleyen bu periodontitis evresinde çiğneme fonksiyonunu etkileyecek düzeyde diş kayıpları olabilmektedir. Periodontitis uygun prosedürlerle

kontrol altına alınmaz veya ağız kapsamlı olarak rehabilite edilmezse tüm dentisyon kaybedilebilir.

Evre IV periodontitis hastalarında;

- İnterdental KAK 5mm'den fazladır.
- Radyografik olarak kökün orta veya apikal üçlüsüne uzanan kemik kayıpları görülebilmektedir.
- Periodontal sebeple diş kaybı en az 5'tir.
- Sekonder okluzal travma ve kemik defektlerine bağlı dişlerde artmış mobilite ve posterior kapanışın bozulması sıklıkla görülür.
- Çiğneme fonksiyonunun stabilizasyonu ve restorasyonu gereklidir.²⁹

Tablo 2.1. Periodontitisin Evreleri ²⁹

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

Periodontitisin ilerleyiş hızı ve tedaviye verdiği yanıt bireyden bireye değişiklik göstermektedir.²⁹ Sigara, diyabet, genetik faktörler, obezite, fiziksel aktivite yetersizliği ve beslenme gibi bilinen risk faktörleri periodontitisin ilerleme hızını etkileyerek evreler içerisinde geçişi hızlandırabilmektedir. Bu değişkenlerin sorgulanmasıyla periodontitisin seyri ve diş kaybı riski tahmin edilebileceğinden periodontal tedavi planlaması açısından önemlidir.²⁹

Periodontitisin Dereceleri

Derecelendirme, periodontitisin ilerleyişini etkileyebilecek bireye ait risk faktörleri tarafından modifiye edilen bir sistemdir.²⁹ Bu sistemde periodontitis seyrini etkileyen primer kriterler bulunmaktadır. Primer kriterler direkt ve indirekt olarak iki gruba ayrılmaktadır. Direkt kriterler longitudinal verilerin bulunduğu radyografik kemik kaybı ve interdental KAK'nın değerlendirildiği bölümdür. İndirekt kriterler hastanın yaşı ve plak/biyofilm depozitlerinin birikimiyle radyografik kemik kaybının değerlendirildiği kısımdır. Derecelendirme sisteminde incelenen diğer bir başlık ise periodontitisin sistemik inflamasyon yükünü artırdığı kısımdır. Derecelendirme A, B, C olarak üç bölümde incelenmektedir (Tablo 2.2).

Derece A: Hastalık yavaş seyirli olup 5 yıldan fazla süreli takipte radyografik kemik kaybı veya KAK izlenmemektedir. Radyografik kemik kaybı yüzdesinin yaşa oranı 0.25'ten azdır. Dental plak miktarı fazla olmasına rağmen yıkım çok düşük seviyededir. Bu bireylerde sigara ve diyabet hikayesi yoktur.²⁹

Derece B: Hastalık orta derecede ilerleme hızına sahiptir ve 5 yıldan fazla süreli takipte 2 mm'den az radyografik kemik kaybı veya KAK görülmektedir. Kemik kaybı yüzdesinin yaşa oranı 0.25 ile 1 arasındadır. Dental plak birikimiyle orantılı olarak kemik yıkımı mevcuttur. Günde 10 adetten az sigara kullanımı vardır ve diyabet hastalarında glikozillenmiş hemoglobin A1c (HbA1c) %7'den düşüktür.²⁹

Derece C: Hastalık hızlı ilerlemektedir ve 5 yıldan uzun süreli takipte en az 2 mm’lik radyografik kemik kaybı veya KAK görülmektedir. Kemik kaybı yüzdesinin yaşa oranı 1’den fazladır. Dental plak miktarına göre periodontal yıkım beklenenden daha fazladır. Günde 10 adet veya daha fazla sigara kullanımı vardır ve diyabet hastalarında HbA1c %7 veya daha fazladır.

Tablo 2.2. Periodontitisin Dereceleri ²⁹

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

2.1.3. Periodontitis Patogenezi

Genel olarak periodontitisin, dişler üzerinde biriken kompleks mikrobiyal dental biyofilm tarafından başlatıldığı kabul edilmektedir.⁴¹ Her ne kadar hastalığı başlatan etki bakteri ve bakteri ürünleri olsa da hastalığın ilerlemesinde konağa ait immüninflatuar yanıt önem taşımaktadır. Periodontal hastalıklara sebep olan bakteriyel ürünler dokulara girerse, doğuştan gelen bağışıklık tepkisinin hücresel ve moleküler unsurları aktive olur. Oral kavitede kolonize olan bakteri türlerinin bazıları periodontal hastalıklarla ilişkilendirilir ve periodontopatojen olarak tanımlanır.⁴² Periodontal hastalıklarda meydana gelen doku yıkım sürecine genel olarak bakıldığında mikroorganizmalar ile konak cevabı arasındaki denge mikroorganizmalar lehine bozulduğunda periodontal yıkım gerçekleşir.⁴³ Mikrobiyota ve konak arasındaki dengenin olumsuz yönde değişmesi, konak yanıtının bozulmasında rol oynayan sistemik hastalıklar (diyabet, romatoid artrit gibi) ya da mikrobiyal yükün artmasıyla gerçekleşmektedir.⁴¹ Yapılan çalışmalarda bakteri ürünlerinin birikimine karşı oluşan immüninflatuar cevabın bireyler arasında farklılık gösterdiği rapor edilmiştir. Bu durum bireyler arasında değişen konak yanıtının önemini göstermektedir.⁴³ Doku yıkım sürecinde ayrıca lokal faktörler (plak birikimi, taşkın restorasyonlar, subgingival bölgeye uzanan çürük lezyonları, diştaşı, furkasyon bölgesi açığa çıkmış dişler, malokluzyon, kök oluk ve konkavite), sistemik faktörler (diyabet), çevresel/davranışsal faktörler (sigara, stres) ve genetik faktörler rol oynamaktadır.⁴³

Klinik ve histopatolojik olarak gingivitis ve periodontitis gelişimi 1976 yılında Page ve Schroeder tarafından histopatolojik olarak başlangıç, erken, yerleşmiş ve ilerlemiş lezyon olmak üzere 4 başlık altında toplanmıştır.⁴⁴

Başlangıç Lezyonu: Plak akümülyasyonunun başlamasından sonraki 2-4 gün içinde meydana gelen histolojik tablodur. Klinik olarak sağlıklı diş eti dokularında görülen ve sadece histolojik olarak fark edebildiğimiz bir durumdur. Subklinik safhadır.

Bu aşamadaki lezyon düşük dereceli inflamasyon, vazodilatasyon ve permeabilitede artış ile tanımlanır. Lipoteikoik asit ve peptidoglikanlar alternatif yoldan kompleman sistemini aktive ederek C3a ve C5a anaflatoksini üretimine neden olur. C3a ve C5a mast hücrelerinden vazoaktif amin (histamin) salgılatır. Damarsal geçirgenlik artar ve ödem oluşur. Artan bu geçirgenlik sonucunda nötrofiller ve monositler bağ dokusundan geçerek kemotaktik uyarının kaynağına, yani diş eti oluğundaki bakteri ürünlerine doğru göç eder. Vasküler sıvı çıkışının artmasıyla DOS miktarında artış görülür.⁴³

Erken Lezyon: Diş eti inflamasyonunun erken klinik bulgularına karşılık gelen bu lezyon, plağın akümülyasyonunu takiben 4-7 gün içinde gelişir. Birleşim epiteline komşu bağ dokusunda lenfosit birikimi vardır. Bu bölgede kollajen yıkıma uğrar. Fibroblastlarda dejenerasyon vardır. Diş etinin mikroskopik incelemesi, birleşim epitelinin altındaki bağ dokusunda, esas olarak lenfositlerden oluşan, ancak aynı zamanda bazı göç eden nötrofillerin yanı sıra makrofajları, mast hücreleri ve plazmadan oluşan bir lökosit infiltrasyonunu ortaya koymaktadır. Erken lezyon safhasında hakim hücreler T lenfositlerdir. Klinik olarak sondalamada kanama görülür.^{43,45}

Yerleşmiş Lezyon: Kronik gingivitis olarak adlandırılan bu tablo plak birikiminin başlangıcından itibaren 14-21. gün civarında ortaya çıkmaktadır.⁴⁵ Periodontal bağ dokusu içinde plazma hücreleri baskındır. Bağ dokusu yıkımı, dişe tutunan bağ dokusu ataşmanında kayba neden olur ve birleşim epiteli periodontal cep oluşturacak şekilde apikale göç eder. Nötrofiller dokularda birikir ve lizozomal içeriklerini hücre dışına bırakırlar.⁴³ Cep epiteli ülser olabilir ve periodontal sondalamaya daha az direnç gösterebilir. Bu nedenle sondalama sırasında kanama, kronik diş eti iltihabının ortak bir özelliğidir.⁴⁶ Etkili plak kontrolü yeniden sağlanırsa, bu inflamatuvar değişiklikler tamamen geri dönebilir.⁴³

İlerlemiş Lezyon: Diş eti iltihabından periodontitise geçişi işaret eder. Nötrofiller cep epitelinde ve periodontal cepte, plazma hücreleri bağ dokularında baskındır. Birleşim epiteli, epitelyal bariyeri korumak için apikale göç eder.⁴⁷ Osteoklastik kemik rezorpsiyonu başlar.⁴³

2.1.4. Periodontal İnflamasyon

Periodontal hastalıklarda görülen doku yıkım mekanizmaları hala tam anlamıyla açıklığa kavuşmamıştır. Fakat, periodontal patojenlerin kendisinin ya da ürünlerinin direkt doku yıkımını gerçekleştirdiği ve bu bakterilere karşı oluşan konak immüninflatuar yanıtın periodontal hastalığın ilerlemesine neden olduğu kabul edilen görüştür. Hatta günümüzde inflamatuvar konak cevabının periodontal doku yıkım sürecinde daha fazla hasara sebep olduğu kabul edilmektedir.^{46,48} Lipopolisakkaritler (LPS), bakteriyel enzimler ve zararlı ürünleri, kamçı, fimbria gibi uzantılar, lökotoxinler, kapsül ve diğer bakteri virülans faktörleri gingival dokuya erişim sağlar. Konak savunma hücrelerinin aktivasyonuna yol açarak inflamatuvar ve immün yanıtı başlatır. Hücresel aktivasyonun bir sonucu olarak inflamatuvar mediyatörler (enzim, sitokinler, kemokinler vb.) ortama salınarak doku tahribatına ve kemik yıkımına neden olurlar.⁴¹

Konak bağışıklık sistemi; inflamasyona karşı başlangıç savunmasını oluşturan doğal bağışıklıktan ve inflamasyona karşı daha özgül bir savunma sağlayan adaptif bağışıklıktan oluşmaktadır. Doğal bağışıklık sistemi ilk savunma hattını oluşturur ve etkisini sitokinler, kemokinler, fagositler (nötrofil, makrofaj, dentritik hücreler) ve doğal öldürücü hücreler (NK) aracılığıyla gösterir.⁴⁹ Adaptif bağışıklık ise, belirli mikroorganizmalara ve toksinlere karşı lenfositleri ve özgül antikorları hazırlayan bir sistemdir. Antijene özgül T ve B lenfositler primer rol oynar. T lenfositler farklılaşarak sitotoksik, yardımcı ve antijen sunan T lenfositleri olarak ortamda bulunurlar. Humoral bağışıklıkta ise antikor üreten plazma hücrelerine farklılaşan B lenfositler, hücre dışı

mikroorganizmaları yok edebilmek için immünglobulinleri salgılar. Bu olaylarla birlikte konağın kontrolü altında doku yıkımı süreci başlamış olur.⁵⁰

Doğal bağışıklık yanıtı inflamasyon etkenine karşı ilk verilen yanıttır ve genel olarak sitokin, kemokin ve fagositlerden (nötrofil, makrofaj ve dentritik hücreler) oluşur. Plak bakterileri ve ürünleri periodontal dokulara nüfuz ederse, bağışıklık sisteminin özel "bekçi hücreleri" onların varlığını tanır ve koruyucu bağışıklık tepkilerine işaret eder. Bu hücreler bakterilerden eksprese edilen mikropla ilişkili moleküler paternler (MİMP) fagositlerdeki model tanıma reseptörleri (MTR) tarafından tespit edilir. Bağışıklık hücreleri üzerindeki MTR'lerden, çoklu MİMP tespit etmesi bakımından önemli yere sahip bir alt sınıf olan Toll-like reseptörler (TLR), periodontal patojenleri tanımada anahtar role sahiptir.⁴⁹ Epitelde, TLR eksprese eden dentritik hücreler savunmanın ön safhalarında bulunur ve doğal bağışıklıkta özelleşmiş bir yanıt oluştururken, bariz bir T hücre yanıtı oluşturur.⁴⁹ Doğal bağışıklık bu yönüyle tamamen non-spesifik bir yanıt sayılmaz.⁴⁹ Fagositlerin TLR'leri tarafından tanınan bakteri veya bakteri ürünleri inflamatuvar yanıtı başlatır. Mast hücrelerinden vasküler permeabilityi artıran ve adezyon proteinlerini (hücreler arası adezyon molekülü-1 (ICAM-1) ve P-selektin) eksprese eden vazoaktif aminler ve tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α) salgılanır.⁴¹ Bu süreç dokuya daha fazla polimorfonükleer lökositlerin (PMNL) geçmesi ve doku yıkımı yapacak lizozomal enzimlerin daha fazla salınmasıyla devam eder. İnflamasyonda aktif bir rezolüsyon meydana gelmezse bakteriyel antijenler, antijen sunan hücreler (dentritik hücreler, B hücreleri ve makrofajlar) ile buluşur.⁵⁰ Antijen sunan hücreler, yardımcı T lenfositleri tarafından karşılanır. Bu karşılaşmanın sonucunda T hücreleri salınımını yapacakları sitokinlere göre başlıca yardımcı T lenfositlerine (Th1, Th2, Th17) ve düzenleyici T hücrelerine (Treg) diferensiye olur.⁴¹ Artmış sitokin yanıtıyla doku yıkım

süreci başlamış olur. Doğal ve kazanılmış bağışıklıkta osteoklast matürasyonu ve direkt kemik yıkımıyla ilişkilendirilen birçok sitokin salınımı görülebilmektedir.^{41,49,50}

2.1.5. Periodontitis Patogenezinde Rol Oynayan Sitokinler

İnterlökin-1 Beta (IL- β)

IL-1 β , iltihaplanma ve bağışıklıkta anahtar bir rol oynar. Doğuştan gelen bağışıklık tepkisi ile yakından bağlantılıdır, enflamatuar değişikliklere ve doku hasarına katkıda bulunan diğer aracılardan sentezini ve salgılanmasını indükler. IL-1 β , prostoglandin E2 (PGE2), trombosit aktive edici faktör ve nitroz oksit sentezini uyarır. Böylece enflamasyonla ilişkili vasküler değişikliklere ve enfeksiyon veya doku yaralanması bölgesine kan akışının artmasına neden olur. IL-1 β esas olarak monositler, makrofajlar ve nötrofiller tarafından ve ayrıca fibroblastlar, keratinositler, epitel hücreleri, B hücreleri ve osteositler gibi diğer hücre tipleri tarafından üretilir. IL-1 β , endotelial hücreler üzerinde ICAM-1 ekspresyonunu artırır ve kemokin (IL-8) salgılanmasını uyarır. Böylece nötrofillerin etkilenen dokulara sızmasını uyarır ve kolaylaştırır. IL-1 β ayrıca kemik rezorpsiyonunu indüklemek için diğer proinflamatuar sitokinler ve PGE2 ile sinerji oluşturur. IL-1 β adaptif bağışıklıkta rol oynar, antijen sunan hücrelerin gelişimini düzenler, makrofajlar tarafından IL-6 salgılanmasını uyarır ve T hücrelerinin antijen aracılı stimülasyonunu artırır. IL-1 β 'nin DOS konsantrasyonları, gingivitis ve periodontitisten etkilenen bölgelerde artar.⁵¹

Tümör Nekrozis Faktör-alfa (TNF- α)

TNF- α , periodontal hastalıkta önemli bir inflammatuar mediatördür. Bağışıklık yanıtlarında temel bir rol oynar, nötrofil aktivitesini artırır ve matriksmetalloproteinaz (MMP) sekresyonunu indükleyerek hücre ve doku döngüsüne aracılık eder. TNF- α , osteoklastların gelişimini uyarır ve fibroblastlarda apoptozu indükleyerek doku onarımını

sınırlar. Makrofajlar ve diş eti fibroblastları tarafından PGE2'nin sentezlenmesini indükler. TNF- α seviyeleri, diş eti iltihabı geliştikçe artar ve periodontitisli bireylerde daha yüksek seviyeler bulunur. TNF- α , IL-1 β ile benzer aktiviteye sahip olmasına rağmen osteoklastlar üzerinde daha az etkiye sahiptir ve iltihaplı diş eti dokularında IL-1 β 'dan daha düşük seviyelerde bulunur.⁵¹

İnterlökin-6 (IL-6)

IL-6 salgılanması, IL-1 β ve TNF- α gibi sitokinler tarafından uyarılır ve bir dizi bağışıklık hücresi (örn., T hücreleri, B hücreleri, makrofajlar, dendritik hücreler) ve yerleşik hücreler tarafından üretilir. IL-6 ayrıca osteoblastlar tarafından salgılanır ve kemik rezorpsiyonunu ve osteoklast gelişimini uyarır. Akut faz yanıtı proteinlerinin sentezini artırır. IL-6, periodontal hastalığı olan hastaların hücrelerinde, dokularında ve DOS'ta yükselir.⁵¹

Periodontitis Patogenezinde Anti-inflamatuar Sitokinler

Anti-inflamatuar sitokinler arasında IL-10, transforme edici büyüme faktörü (TGF- β), IL-1RA, IL-1F5 ve IL-1F10 bulunur. IL-10 sitokin ailesi, immünosüpresif özelliklere sahiptir. Monositler ve makrofajlar tarafından sitokin salgılanmasını baskılar. TGF- β , sitokin olarak işlev gören bir büyüme faktörüdür. Aynı zamanda onarım ve rejenerasyonda da rol oynar. Periodontitis ve gingivitisli hastaların DOS ve periodontal dokularında TGF- β seviyeleri, periodontal olarak sağlıklı hastalara göre daha yüksektir.⁵¹

Kemik Kaybında Rol Oynayan Sitokinler

Normal fizyolojik koşullar altında kemik rezorpsiyonu ve oluşumu arasında bir denge vardır. Bu denge, yapısal olarak bütünlüğü ve kemik homeostazisini sağlar.⁵² İlerleyen inflammatuar durum alveoler kemiğe yaklaştıkça osteoklastik kemik rezorpsiyonu başlar. Kemik kaybının meydana gelip gelmediğini iki kritik faktör belirler:

1) Diş eti dokularındaki enflamatuvar mediatörlerin konsantrasyonu, kemik kaybına yol açan yolları aktive etmek için yeterli miktarda olmalıdır.

2) İnflamatuvar mediatörler, alveolar kemiğin kritik bir mesafesine kadar nüfuz etmelidir.

Osteoklastlar, proenflamatuvar sitokinler ve diğer enflamasyon araçları tarafından kemiği rezorbe etmesi için uyarılır ve alveolar kemik, ilerleyen enflamatuvar alandan geri çekilir. Osteoklastlar, osteoklast progenitör hücreleri ve makrofajlardan oluşan çok çekirdekli hücrelerdir ve osteoklastik kemik rezorpsiyonu çeşitli araçlar (IL-1 β , TNF- α , IL-6, PGE2) tarafından etkinleştirilir. Aynı zamanda kemik rezorpsiyonunu uyaran diğer mediatörler arasında onkostatin M, bradikinin, trombin ve çeşitli kemokinler de vardır. Periodontitisin ilerlediğini gösteren en önemli belirteç alveolar kemik kaybının gözlemlenmesidir. Periodontopatojen bakterilere karşı oluşan lokal immün yanıt, kemiğin homeostatik dengesini bozmakta ve kemik rezorpsiyonuna neden olmaktadır.⁵³ Osteoklastların aktivasyonu ve farklılaşması, TNF ligandı ve reseptör süper ailesinin üyeleri olan reseptör aktivatör nükleer faktör kappa B (RANK), RANK ligandı (RANKL) ve osteoprotegerin (OPG) tarafından düzenlenir.⁵³ RANK, osteoklast progenitör hücreleri ve ayrıca olgun osteoklastlar tarafından eksprese edilen bir hücre yüzeyi reseptörüdür.⁴² RANKL, osteoklast ve preosteoklast hücre yüzey reseptörü olan RANK'a bağlandığında farklılaşmayı ve proliferasyonu sağlayarak osteoklastik aktiviteyi uyarır. OPG, RANKL'ın inhibitörüdür ve bir tuzak reseptörü olarak işlev görür. Yani RANKL'a bağlanır ve RANK ile etkileşime girmesini engeller. OPG, esas olarak osteoblastlar, fibroblastlar ve kemik iliği stromal hücreleri tarafından salgılanır.⁵³ Periodontitis vakalarında RANKL ekspresyonundaki artışın, RANKL/OPG oranını artırdığı ve makrofaj öncü hücrelerinin osteoklastlara farklılaşmasını uyardığı gösterilmiştir.⁵² Periodontitisli bireylerde, proinflamatuvar sitokinlerin (IL-1 β , TNF- α) yüksek seviyeleri ve artan sayıda infiltrate T hücresi, RANK tarafından osteoklastların aktivasyonuna yol

açar, bu da alveoler kemik kaybına neden olur. Periodontitiste DOS'ta RANKL/OPG oranı yüksektir. İnflamasyonun ve mikrobiyal plağa karşı konak yanıtının düzenlenmesi, RANKL/OPG oranının ve dolayısıyla kemik yıkımının azalmasını sağlamak periodontal tedavide hedeflenen sonuçlardır.⁵²

2.2. Oksidan ve Antioksidan Sistem

Normal oksijenin az bir kısmı başlıca mitokondri olmak üzere hücresel kompartımanlardaki metabolizma sırasında indirgenerek reaktif oksijen türlerine (ROT) dönüşür. Başlıca ROT'lar Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), Hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$) ve Hidrojen peroksit (H_2O_2)'tir. Bunlardan ilk ikisi serbest radikal olup hidrojen peroksit ise prooksidandır. ROT'lar hücre sinyalizasyonunda önemli rol oynamakla birlikte yüksek seviyelere ulaştığında hücre hasarına neden olmaktadır.^{2,54} Biyolojik sistemlerde genel olarak serbest radikallerin daha spesifik bir alt grup olarak ise ROT'ların hücresel yapılara vereceği hasarı engellemek için antioksidan sistemler veya kısaca antioksidanlar olarak adlandırılan savunma mekanizmaları mevcuttur. Antioksidanlar, endojen ve ekzojen antioksidanlar olmak üzere iki grupta sınıflandırılır.⁵⁵

Antioksidanların etki mekanizmaları;

- a) Oksijeni ortamdan uzaklaştırır veya lokal olarak bulunduğu yerde konsantrasyonunu azaltırlar
- b) Katalitik metal iyonlarını ortamdan uzaklaştırırlar
- c) Süperoksit veya hidrojen peroksit gibi anahtar role sahip ROT'ları ortamdan uzaklaştırır veya daha zayıf moleküllere çevirirler
- d) Serbest radikal hasarına yol açan zincirleme reaksiyonların başlamasını engellerler
- e) Serbest radikallere bağlı oluşan hasarı onarıcı etkiler gösterirler.^{56,57}

Oksidatif stres ile karakterize edilen bir ortamın oluşturulması, proinflamatuvar koşulları arttırabilir⁵⁸. Bu durum sonucunda, tip 2 diyabet, obezite ve romatoid artrit,⁵⁹⁻⁶² gibi birçok karmaşık çok faktörlü bozukluğun ortaya çıktığı bilinmektedir. Bu hastalıklar, ROT'ların artan üretimi oksidatif stresin gelişimi de dahil olmak üzere periodontitis ile ortak özellikler taşır. Oksidatif stres bu durumların gelişmesinde ve ilerlemesinde rol oynayabilir.^{63,64} Dolayısıyla bu tür hastalıkların ciddi periodontal hastalıklarla korelasyonu ve proinflamatuvar benzerlikleri büyük önem taşımaktadır.

2.2.1 Reaktif Oksijen Türlerinin Periodontitis Patogenezindeki Rolü

Reaktif oksijen türleri (ROT) moleküler oksijen olarak tanımlanır⁶⁵. Organizmada serbest radikallerin oluşumu ve bunların ortadan kaldırılması fizyolojik olarak sürekli bir denge içerisinde. Oksidatif stres, hücre metabolizma sırasında oluşan hidroksil radikali, süperoksit radikali ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerinin artışı ile onları detoksifiye eden antioksidanların yetersizliği sonucu oksidatif dengenin bozulması olarak tanımlanır.⁶⁶ Oksidatif streste artışı sonucunda oluşan ROT'lar hücre içi lipit ve protein yapıların çift bağ içeren gruplarına ve DNA'daki bazların çift bağlarına saldırır ve bir hidrojen atomu kopararak zincirleme oksidasyon reaksiyonlarını başlatırlar. Sonuçta hücre içi lipit, protein ve DNA gibi makromoleküller hasarlanarak hücre zedelenmesi veya hücre ölümü meydana gelir.²

Kronik inflamatuvar yanıt ROT'un çok miktarda üretildiği önemli bir durumdur. Periodontitis gibi kronik inflamatuvar hastalıkların oksidatif stres ile ilişkili olduğu ve fagositozdan sonra meydana gelen solunum patlamasının patogenezde rol oynadığı bilinmektedir. ROT'lar, periodontal sağlık sırasında istilacı patojenik mikroorganizmaları öldürmeye yardımcı olabilir, ancak aşırı aktif hale getirildiğinde konakçı hücreler için sitotoksik hale gelebilir. ROT'lar hücre sinyalleşmesinde, gen regülasyonunda ve antimikrobiyal savunmada önemli bir rol oynar.⁶⁷ Ancak ROT'ların aşırı miktarı,

değişmemiş veya azalmış antioksidan kapasiteyle birlikte oksidan yükün artmasına neden olur ve etkilenen dokularda oksidatif strese neden olur. Daha sonra patolojik değişikliklere ve dolayısıyla konakçı dokuların tahrip olmasına yol açar⁶⁸. Hücre içi olarak ROT'lar, biyomoleküllere ve hücre membranlarına zarar verir.⁶⁹

Literatürdeki klinik ve hayvan çalışmaları, periodontal inflamasyonun aşırı lipit peroksidasyonuna neden olduğunu göstermiştir.^{70,71} Çok sayıda çalışma periodontitisin sonuçlarının ağız sağlığının çok ötesine uzandığını ve ateroskleroz⁷², inme⁷³ ve osteoporoz⁷⁴ gibi majör hastalıklarla ilişkili olabileceğini göstermiştir. Sınırlı sayıda çalışma, periodontal hastalık ile sindirim sistemi organları arasındaki ilişkiyi ele almıştır. Mevcut literatüre bakıldığında periodontal hastalık ile non alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAYKH) arasındaki ilişki son yıllarda güncel bir çalışma alanı olmuştur.⁵⁻¹² Düşük seviyeli inflamasyon oksidatif stresi artırmaktadır ve yapılan çalışmalar periodontal inflamatuvar stresin çeşitli düzeylerde karaciğer fonksiyon bozukluklarına neden olarak NAYKH riskini arttırdığını göstermektedir.^{6,11,13,14}

2.2.2 Toplam Antioksidan Seviye, Toplam Oksidan Seviye ve Oksidatif Stres İndeksi

ROT konsantrasyonları, çeşitli yöntemlerle serum veya plazmada birbirinden bağımsız olarak ölçülebilir. Oksidatif dengenin oksidanlar yönüne kaydığı durumlarda artan bu moleküller, birbiri üzerine eklenerek tespit edilebilir. Ancak her birini ayrı ayrı ölçmek yerine toplam ölçümün daha pratik olacağı düşünülerek Erel tarafından tamamen otomatik bir kolorimetrik yöntem geliştirilmiştir.⁷⁵ Serum, plazma ve vücut sıvılarında çok sayıda antioksidan bulunmaktadır. Bu antioksidanların birbirleriyle etkileşimleri sonucunda antioksidan kapasitesinde artış gözlemlenmektedir. Bu sebeple, her bir

antioksidanı ayrı ayrı ölçmek yerine toplam antioksidan seviye (TAS) ölçümü daha faydalı olacaktır.⁷⁶ Antioksidanların oksidatif stres mekanizması üzerindeki genel etkilerini değerlendirmek için TAS'ın daha pratik ve güvenilir bir yöntem olduğu kabul edilmektedir. Düşük TAS seviyeleri, oksidatif strese ve oksidatif hasara karşı duyarlılıktaki artışı yansıtmaktadır. Bununla birlikte, TAS'ın yaş, beslenme ve cinsiyet gibi faktörlerden etkilendiği bilinmektedir. Bu nedenle doğrudan oksidatif stresi ölçen toplam oksidan seviye (TOS) kadar etkili bir gösterge değildir. İnsan ve hayvan çalışmalarında,⁷⁷⁻⁸⁰ TOS/TAS oranı ile ölçülen oksidatif stres indeksi (OSİ)'nin oksidatif stres seviyesini değerlendirmek için pratik ve güvenilir bir yöntem olduğu belirtilmiştir. Ayrıca OSİ ile periodontal durum arasında güçlü bir ilişki olduğu bildirilmiştir.^{78,79,81} Bu nedenle OSİ, periodontal dokulardaki oksidatif hasarı değerlendirmek için yararlı ve pratik bir biyobelirteç olabilir.^{77,78}

2.2.3. Malondialdehit

Lipit peroksidasyonu, ROT üretimi yüksek seviyelere ulaştığında kaçınılmaz bir süreçtir. Oksijenin doymamış lipitlerle peroksidasyonu, çeşitli oksidasyon ürünlerinin oluşmasına yol açmaktadır. Lipit peroksidasyonunun temel bileşiği lipit hidroperoksittir (LOOH). Lipit hidroperoksitin aldehitlere ve diğer karbonil bileşiklerine dönüşmesiyle lipit peroksidasyonu sona erer. Bu bileşiklerden biri malondialdehit (MDA)'tır ve lipit peroksit seviyelerini ölçmek amacıyla yapılan araştırmalarda sıklıkla kullanılır. MDA, membranlardaki doymamış yağ asitlerinin serbest radikaller aracılığıyla gerçekleşen lipit peroksidasyonunun son ürünüdür ve oksidatif hasarın bir göstergesidir. Aldehit yapısındaki bileşiklerin yaşam süreleri oldukça uzun olduğundan, lipit peroksidasyonunun etkileri kan, doku ve organlarda görülebilir.^{82,83} Hücredeki DNA ve proteinlerle bağlar oluşturarak toksik ve mutajenik etkiler yaratırlar.⁸⁴ Lipit peroksidasyonu, oksidatif stres ve serbest radikallere bağlı olarak hücre hasarında

özellikle mikrozomlar, mitokondri ve endoplazmik retikulumda patogenezin en önemli aktörüdür.^{85,86} Hücre ve dokulardaki hasar, serbest radikal üretimine ve oksidatif strese neden olur. Oksidatif stresten doğrudan veya dolaylı olarak sorumlu olan faktörlerin tümü, bağışıklık sistemine dahil olmaktadır.⁸⁷

2.2.4. Glutasyon

Glutasyon (GSH), protein olmayan bir tiyol bileşiği olup önemli bir antioksidandır.⁸⁸ Hücre içindeki temel antioksidan olarak kabul edilir ve hücresel oksidatif hasarın engellenmesinde önemli bir işlevi vardır.⁸⁹ Karaciğer başta olmak üzere tüm organlarda sentezlenir.⁸⁸ Toplam GSH'ın yaklaşık %90'ı sitoplazmada bulunurken, geri kalan kısmı mitokondri ve diğer organellerde yer alır.⁹⁰ GSH, hücrelerde serbest olarak veya proteinlere bağlı şekilde bulunabilir. Serbest glutasyon genellikle redükte formda bulunur ve oksidatif stres durumunda okside forma dönüşür.⁹¹ GSH döngüsünün sürekliliğini sağlayan en önemli organlar karaciğer ve böbreklerdir.⁹² Böbreklerdeki glutasyonun büyük bölümü, böbrek hücrelerinden tübüllere transfer edilerek karşılanırken, geri kalan miktar ise plazmanın glomerüler filtrasyonu sonucu elde edilir.⁹³ Geri dönüşümsüz hücre hasarı oluştuğunda, hücredeki GSH içeriği değişir. Bu sebeple, GSH konsantrasyonunun ölçülmesi, farklı patolojik durumların anlaşılmasında önemli bir gösterge olarak kullanılır.⁹² GSH, pek çok reaksiyon için redükte etme kapasitesine sahip olup, hidrojen peroksit, diğer peroksitler ve serbest radikallerin detoksifikasyonunda önemli rol oynar. Aynı şekilde, glutasyon bağımlı enzimler, serbest radikallerin yayılmasını engellemekle kalmaz, aynı zamanda ROT tarafından üretilen bileşiklerin detoksifikasyonunu da sağlar. GSH bağımlı proteinlerin çoğu, antioksidan ajanlar tarafından uyarılarak oksidatif stresin dengelenmesine yardımcı olur.⁹⁴

2.3. Karaciğer

Karaciğer vücuttaki en büyük organdır ve ortalama vücut ağırlığının yaklaşık %2-%3'ünü oluşturur. Karaciğerde, morfolojik anatomi ve fonksiyonel anatomi olmak üzere tipik olarak iki şekilde tanımlanan 2 lob bulunur. Karın boşluğunun sağ üst kadranında sağ hemidiyaframın altında yer alır, göğüs kafesi tarafından korunur ve ligaman ekleri olarak adlandırılan periton yansımaları yoluyla konumunu korur. Gerçek bağlar olmasa da, bu bağlantılar avaskülerdir ve glisson kapsülü veya karaciğerin visseral peritonunun eşdeğeri ile devamlılık halindedir.⁹⁵

Karaciğer metabolizma, sentez ve detoksifikasyon fonksiyonları açısından öne çıkan bir organdır. Aynı zamanda kan şekeri ve lipidlerin düzenlenmesinde de önemli bir rol oynar ve doku hasarından sonra bile yenilenme potansiyeline sahiptir.⁹⁶ Karaciğerin homeostaz ve inflamatuvar yanıtındaki merkezi işlevi, benzersiz anatomik konumu sayesinde mümkün olur. Sistemik dolaşımdan ve gastrointestinal sistemden ikili kan desteği alan en büyük parankimal organdır.⁹⁷ Karaciğer, kan desteğinin %80'ini bakteriyel ürünler, çevresel toksinler ve besin antijenleri açısından zengin olan bağırsak portal damarından alır. Geriye kalan %20'lik kısım ise abdominal aorttan ayrılan besleyici damar olan hepatik arterden kaynaklanır. İki dolaşım sisteminden gelen kan, hepatik hilusta birleşir ve daha sonra sinüzoidler adı verilen kılcak bir ağ yoluyla karaciğere yayılır. Özetle, karaciğer insan vücudunun, sinüzoidler yoluyla sürekli olarak karaciğere akan büyük miktardaki kandan, metabolik olarak aktif hepatositlerden, parankimal olmayan hepatositlerden ve çeşitli bağışıklık hücrelerinden oluşan hemodinamik birleşimidir.⁹⁸

Özellikle karaciğer fonksiyonu, zararlı bir bağışıklık tepkisine neden olmadan potansiyel olarak toksik maddelere karşı etkili ve hızlı koruma sağlamak için güçlü, doğuştan gelen bağışıklık sistemine bağlıdır.^{96,97} Bu rol, mikroorganizmaların immünolojik olarak ortadan kaldırılması ve atık moleküllerin uzaklaştırılmasında doğuştan gelen bağışıklık hücrelerinin intrahepatik zenginleşmesini içerir.⁹⁹ İntrahepatik

bağışıklık hücreleri ile hepatositler arasındaki bu tür karmaşık iletişime öncelikle bağışıklık hücrelerinin ve hücre homeostazisini kontrol eden hepatositik hücre içi sinyal yollarının efektör fonksiyonlarını aktive eden sitokinler aracılık eder. Kupffer hücreleri ve karaciğere sızan monosit türevi makrofajlar, TNF- α ve IL-6 gibi sitokinlerin ana kaynaklarıdır. Ayrıca çok sayıda çözünür patojen tanıyan reseptör ve kompleman bileşeninin biyosentezi, sistemik doğuştan gelen bağışıklığın kontrolünde önemli bir rol oynar.⁹⁷

Ancak karaciğer, ilaçların, mikroorganizmaların ve çevresel faktörlerin etkisiyle metabolik ve endokrin bozukluklara karşı hassastır ve bu dengesizlik patolojik sonuçlara yol açabilir.⁹⁸ Yenilenme kapasitesi göz önüne alındığında, karaciğer birçok durumda ciddi hasarın üstesinden gelebilir, ancak kronik hasar, homeostatik dengesizliği giderek arttırarak steatoz, hepatit, fibroz, siroz ve hepatoselüler karsinom gibi çeşitli kronik karaciğer hastalıklarına neden olur.

2.3.1. Non Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı ve Non Alkolik Steatohepatitin Tanımı, Yaygınlığı ve Epidemiyolojisi

Hem çocukları hem de yetişkinleri etkileyen non alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAYKH), şu anda dünya çapında en yaygın kronik karaciğer hastalığıdır.¹⁰⁰ NAYKH, hepatik steatozun varlığını gösteren (hepatositlerin %5'inden fazlası yağlıdır) ancak aşırı alkol tüketimi, kronik viral hepatit, otoimmün hepatit, steatozu tetikleyen ilaçların uzun süreli kullanımı veya konjenital hepatik bozukluklar gibi sekonder hepatik yağ birikimi gibi nedenlerden kaynaklı olmayan yağlı karaciğer hastalığı olarak tanımlanır.¹⁰¹⁻¹⁰⁴ Alkolsüz yağlı karaciğer hastalıklarının çoğunluğu, iyi prognoza sahip alkolsüz yağlı karaciğerdir (basit steatoz), ancak bu hastaların yaklaşık %20-%30'undan oluşan bir alt grup, karaciğer hastalığının daha ciddi formlarına yani non alkolik steatohepatite (NASH)

ilerleyebilir.¹⁰² NASH, lipit birikimine ek olarak inflamatuvar hücre infiltrasyonu, hepatositlerde balonlaşan dejenerasyon ve fibrozis gibi histolojik bulgularla karakterizedir. Kan biyobelirteçleri ve ultrasonografi gibi invaziv olmayan muayeneler kullanılarak basit yağlı karaciğer ile NASH arasında ayrım yapmak son derece zordur.¹⁰⁵ Bu nedenle, NASH'nin teşhisinde altın standart, karaciğer biyopsisi ve ikincil nedenlerin dışlanması olmaya devam etmektedir.¹⁰⁶ Metabolik sendromun karaciğer fenotipi olarak da bilinen NASH, obezite ve diyabet gibi ciddi metabolik komplikasyonlarla güçlü bir şekilde ilişkilidir.¹⁰⁷ Ayrıca NASH hastalarının bir kısmının son dönem karaciğer hastalıkları olan siroz ve hepatoselüler karsinoma ilerlediği rapor edilmiştir.^{108,109}

NAYKH'nın prevalansının, çalışma popülasyonuna ve kullanılan tanı yöntemlerine bağlı olarak %20-%50 arasında değiştiği tahmin edilmektedir. Ayrıca bu oran, obez bireylerin sayısı arttıkça dünya çapında artmaya devam etmektedir.¹¹⁰⁻¹¹² Younossi ve ark.'nın¹¹³ yaptığı meta analiz çalışması, NAYKH'nın küresel prevalansının %25,24 olduğunu, en yüksek oranın Orta Doğu ve Güney Amerika'da olduğunu, bunu Asya, Kuzey Amerika, Avrupa ve Afrika'nın takip ettiğini ortaya koydu. Farklı ülkelerde NAYKH'nın yıllık görülme sıklığının 1000 kişi başına 20-50 vaka arasında değiştiği bildirilmektedir.¹⁰¹ Dolayısıyla NAYKH ve NASH, yeni kronik karaciğer hastalığı salgınının merkezinde yer almakta, önemli bir klinik ve ekonomik yüke aracılık etmektedir.^{114,115}

2.3.2. Non Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı ve Non Alkolik Steatohepatitin Etiyolojisi ve Patofizyolojisi

NAYKH ve NASH'in patogenezi, değişen enerji metabolizması, değişen konakçı bağışıklık sistemi, enterobakteriler ve genetik yatkınlık gibi birçok faktör ve süreci içerir.

Şimdiye kadar başlangıç ve ilerleme mekanizması Day ve James tarafından öne sürülen “iki vuruş teorisi” perspektifinden açıklanıyordu.^{116,117} Bu teoriye göre ilk vuruş hareketsiz bir yaşam tarzı ve yüksek yağlı beslenmeyi içeriyor. Obezite ve insülin direnci, hepatik lipit birikimini artırır ve karaciğerin yağlanması tetikler, böylece karaciğeri daha fazla olumsuz uyarana karşı duyarlı hale getirir. Daha sonra, proinflatuar sitokinler, bağırsak mikrobiyotasından türetilen bileşenler, oksidatif stres ve lipid peroksit gibi hepatositlere zarar veren çeşitli faktörlerin, yağlı karaciğerde nekrotik inflamasyona ve fibrozise yol açan ikinci darbe olarak etki ettiği varsayılmıştır. Ancak iki vuruş teorisi tek başına NAYKH’nda ortaya çıkan tüm moleküler ve metabolik değişiklikleri açıklamak için yeterli değildir. Bazı durumlarda inflamasyonun hepatik steatozdan önce geldiğini varsaymak gerekir.^{118,119} Bu nedenle mevcut yaklaşımda yaygın olarak kabul edilen teori, "çoklu paralel vuruş hipotezi"dir.

NAYKH'nin patofizyolojisi ve ilerlemesi, “çoklu paralel vuruş” modelinde^{119,120} birçok faktör tarafından tetiklenmektedir. Bu bağlamda çok sayıda genetik ve çevresel faktör bireysel olarak etkileşime girer. Her NAYKH hastası, yaşam boyu farklı bir patojenik kombinasyondan dinamik olarak etkilenmiştir. Bu faktörler arasında, bunlarla sınırlı olmamak üzere, spesifik genetik polimorfizmler ve epigenetik modifikasyonlar,¹²¹ diyet (örn., aşırı yağ ve fruktoz), fiziksel aktivite eksikliği,¹²² obezite ve insülin direnci (IR),¹²³ adipokinlerin düzensizliği,¹²⁴ lipotoksisite,¹²⁵ endoplazmik retikulum stresi ve oksidatif stres,¹¹⁹ bağırsak mikrobiyotasındaki disbiyoz¹²⁶ ve endokrin bozukluklar¹²⁷ yer alır. Birbiriyle dinamik bir şekilde etkileşime giren bu faktörlerden bazılarının birleşik etkisi altında, lipitler başlangıçta hepatositlerde birikir ve basit steatoz (BS)'ye yol açar. BS zamanında tedavi edilmezse, karaciğere bağışıklık hücreleri sızar ve böylece NASH olarak karakterize edilen bir durum olan inflamatuvar bir süreç eklenir.¹²⁸

2.3.3. Patolojik Tanı

NASH'nin tanısında karaciğer biyopsisi altın standarttır. NAYKH'nda karaciğer biyopsisinin ne zaman alınacağına ilişkin kriterler henüz belirlenmemiş olsa da, diğer kronik hastalıklardan ayırt edilmesi zorsa veya NASH şüphesi varsa karaciğer biyopsisi düşünülmelidir. Çeşitli patolojiye dayalı sınıflandırma sistemleri kullanılmıştır. Matteoni'nin kriterleri¹²⁹ NAYKH'nı tip I (sadece steatoz), tip II (sadece lobüler inflamasyonla birlikte steatoz), tip III (hepatoselüler balonlaşmayla birlikte steatoz) ve tip IV (tip III + Mallory-Denk cisimcikleri veya fibrozis) olarak sınıflandırır. Ayrıca tip III ve IV, NASH için tanısaldır. Brunt kriterleri¹³⁰ NASH patolojik bulgularını inflamasyon derecesine (derece 1-3) ve fibroze (evre 0-4) göre değerlendirir ve sınıflandırır. Ayrıca, Kleiner ve ark.¹³¹ karaciğer dokusu bulgularını steatoz derecesine (puan 0-3), lobüler inflamasyon derecesine (puan 0-3) ve hepatosit balonlaşmasının sıklığına (puan 0-2) dayalı olarak toplam puanlarla puanladılar. NAYKH tanımı olarak NASH için toplam skor 5 veya daha fazla, NASH olmayan için 2 veya daha az ve sınırda vakalar için 3-4 toplam skorları NAYKH aktivite puanı olarak bilinir. Ayrıca NAYKH aktivite skorundan ayrı olarak değerlendirilen 0'dan 4'e kadar bir skor kullanarak fibrozisin evresini tanımlamışlardır.¹³¹

2.3.4. Abdominal Ultrasonografi ve Bilgisayarlı Tomografi

Abdominal sonografi (ultrason), orta veya yüksek seviyede yağ birikiminin varlığında veya yokluğunda yüksek tespit kabiliyetine sahiptir ve bu nedenle NAYKH tanısında faydalıdır.^{132,133} Ancak inflamasyon ve fibrozis derecesini değerlendirmek zordur.^{134,135} NAYKH ile erken NASH arasında ayırım yapmak için de kullanılamaz.^{136,137} Bu yöntemle yağlı karaciğer tanısı parlak karaciğer olarak tanımlanmıştır. Böbreklere kıyasla karaciğer eko dokusunun artması, damar bulanıklaşması ve karaciğerin derin zayıflaması meydana gelir.

2.3.5. Kan Biyobelirteçleri

Serum alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), gama-glutamil transpeptidaz, trombositler, albümin, trigliserit, kolinesteraz, açlık plazma insülini, insülin direncinin değerlendirilmesine yönelik homeostaz modeli ve diğer belirteçler, karaciğer koşullarının göstergeleri olarak kullanılmıştır.¹³² Her ne kadar yerleşik bir durum tespit edilmemiş olsa da NASH saptamak için kullanılan biyobelirteçler arasında yer alan ALT, NAYKH için yararlı bir tarama yöntemi olabilir.¹³⁸ Bununla birlikte, ALT için konsensüs kesme değeri yoktur ve çalışmalara bağlı olarak 40-75 IU/L arasında değişmektedir.¹³⁹⁻¹⁴¹ ALT de hastalığın şiddetinin iyi bir göstergesi değildir. Buna karşılık, AST'nin ALT'ye oranının fibrozis ilerlemesinin bir göstergesi olduğu kabul edilir ve NASH için 1,0, NAYKH için 0,8 kesme değerleri tavsiye edilir.

2.3.6. Formula Skorlama Sistemi

NAYKH ile NASH'nin tanısı ve tahmini için özel bir formül kullanan çeşitli skorlama sistemleri geliştirilmiştir. NAYKH fibrozis skoru¹⁴² ileri fibrozis vakalarını tahmin etmek için kullanılan bir sistemdir. NAYKH fibrozis skorunun formülü yaş, vücut kitle indeksi, bozulmuş açlık glisemisi veya diyabet, AST/ALT, trombositler ve albümini içerir. Yağlı karaciğer indeksi¹⁴³ NAYKH başlangıcını tahmin etmek için geliştirilmiştir ve formül trigliserit, vücut kitle indeksi, gama-glutamil transpeptidaz ve bel çevresinden oluşur. Yağlı karaciğer indeksi, etnik farklılıklar dikkate alınarak ABD vatandaşları için daha da değiştirilmiştir.¹⁴⁴ Hepatik steatoz indeksi,¹⁴⁵ NAYKH değerlendirmesini basitleştiren bir sistemdir ve formül, ALT/AST, vücut kitle indeksi, cinsiyet ve diyabeti içerir.

2.3.7. Apoptozis ve Kaspazlar

Apoptoz, programlı hücre ölümü olarak bilinen enerji gerektiren fizyolojik bir süreçtir. Organizmanın ihtiyaç duymadığı, biyolojik görevini tamamlamış ya da hasarlı

hücreleri genetik düzeyde de kontrol ederek yok eden bir mekanizmadır. Kaspazlar, sistein proteazlardır ve aspartik asitten sonraki peptid bağı kırarlar. Hücrede inaktiftirler, ancak proteolitik olarak birbirlerini aktifleştirirler. 100 farklı hedef proteini keserek apoptoza neden olurlar ve 3 tiptirler:

I- Başlatıcı kaspazlar (Kaspaz 2, 8, 9, 10),

II- Efektör kaspazlar (Kaspaz 3, 6, 7),

III- İnflamatuar kaspazlar (Kaspaz 1, 4, 5, 11, 12, 13, 14).

DNA tamiri ve replikasyonu için gerekli enzimleri inaktive ederler. Hücre iskeleti proteinlerini keserek hücre zarının tomurcuklanmasına neden olurlar.¹⁴⁶⁻¹⁴⁸ Kaspaz 3'ün, karaciğerdeki ana ara parça proteini olan sitokeratin-18 (CK-18) dahil olmak üzere birçok hücresel substratı parçaladığı bilinmektedir.¹⁴⁹ Kaspaz 3 tarafından üretilen CK-18 fragmanları, NAYKH'ndan şüphelenilen hastalarda NASH'nin bağımsız bir belirleyicisidir.^{149,150} Trafikle ilişkili hava kirliliğinin aşırı kilolu ve obez pediatrik popülasyonda hepatoselüler apoptozun bir belirteci olan CK-18 ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.¹⁵¹ Mallory-Denk cisimcikleri (MDB) hem alkoliklerin hem de NASH'nin karakteristiğidir ve nispeten iyi huylu basit steatoz ile daha agresif NASH arasında ayrım yapar. CK-18'i aşırı eksprese eden genetik olarak duyarlı farelerde, yüksek yağlı diyet (HFD) tüketiminin hepatoselüler hasarı, balonlamayı, apoptozu, inflamasyonu ve MDB gelişimini tetiklediği gösterilmiştir.¹⁵²

2.4. Periodontitis ve NAYKH

Vücudun hemodinamisinde rol oynayan karaciğer, hepatik arteriyel ve portal sistemleri birbirine bağlayarak, oksijenli kan ile portal sistemden gelen kanın karışımını sağlar. Bu nedenle periodontitis durumunda karaciğer, ağız boşluğundan sistemik olarak yayılan bakteriler ve bunların bileşenleri, inflammatuar sitokinler ve ROT'lar gibi çeşitli

patojenik faktörlere sürekli maruz kalır. Bu durum NAYKH'nı ve NASH'yi teşvik edebilir.^{10,13}

2.4.1. Proinflamatuvar Sitokinler ve Adipokinler

Yağ dokusu tarafından üretilen TNF- α , IL-6, leptin ve adiponektin gibi adipokinler, NAYKH'nda hepatik lipid birikimi, inflamasyon, fibrozis ve karsinogenez ile yakından ilişkilidir.¹⁵³ Obezlerin genişlemiş yağ dokusunda kemoatraktan protein-1'in artan salgılanması, inflamatuvar hücrelerin, özellikle de makrofajların infiltrasyonuna neden olur. Bunlar daha sonra inflamatuvar sitokinler ve adipositlerin adipokin üretimi dengesini bozan kemokinleri salgılar.¹⁵⁴ Adipokinler, lokal yağ dokusunda sadece kronik inflamasyonu ve insülin direncini değil aynı zamanda hepatik insülin duyarlılığını da doğrudan etkiler.¹⁵⁵

Periodontal hastalık, obeziteye benzer şekilde TNF- α ve IL-6 dahil olmak üzere proinflamatuvar sitokinlerin kan düzeylerini artıran düşük dereceli sistemik inflamatuvar durum ile karakterize edilir ve periodontal hastalık ile çift yönlü ilişkide NAYKH için potansiyel bir risk olduğunu düşündürür. Özellikle, TNF- α hepatik insülin direncinde önemli bir rol oynar ve bir serin/treonin kinazın aktivasyonu yoluyla serin fosforilasyonu yoluyla insülin reseptör substratını inaktive eder. Böylece insülin reseptörü sinyalleme kaskadını bloke eder.¹⁵⁶ IL-6 ve TNF- α tarafından yukarı doğru düzenlenen bu faktör aynı zamanda insülin sinyalinin azalması ve yağ asidi oksidasyonunun indüklenmesinin yanı sıra karaciğer tarafından C-reaktif proteinin salgılanmasıyla da ilişkilidir.^{157,158}

Adipositler gibi, periodontal doku içindeki hücreler de çeşitli adipokinler salgılayabilir.^{157,159,160} Periodontitisli hastalarda leptin, visfatin ve resistin gibi proinflamatuvar adipositokinlerin serum seviyeleri yükselir ve anti-inflamatuvar adipokin olan adiponektinin serum seviyeleri azalır.¹⁶¹⁻¹⁶⁴ Yapılan çalışmalar leptinin normal

olarak hem anorektik etki yoluyla hem de glikolipid metabolizmasını iyileştirerek karaciğerde lipit birikimini baskılamada merkezi bir rol oynadığını, ancak aynı zamanda karaciğer fibrozisi ve hepatoselüler karsinom oluşumunda da rol oynadığını göstermiştir.^{165,166} Öte yandan yararlı bir adipokin olan adiponektin, insülin duyarlılığını ve anti-inflamatuvar etkileri artırmanın yanı sıra, hepatik yağ asidi metabolizmasını destekler.¹⁵⁸ Bu nedenle klinik çalışmalar hipoadiponektineminin metabolik sendrom ve alkolsüz steatohepatit gelişimi için bir risk faktörü olduğunu göstermiştir.¹⁶⁷⁻¹⁶⁹

2.4.2. Oksidatif Stres

Periodontal hastalığın gelişiminde, aktive edilmiş PMNL'ler, periodontal doku tahribatına katılan büyük miktarda ROT üretir.^{2,170} Oksidatif stres aynı zamanda periodontitis ile sistemik hastalıkları birbirine bağlayan mekanizmayı açıklamak için kullanılan ana araçlardan biridir. Çünkü periodontitis, obezite ve NAYKH gibi çeşitli hastalıklarla ilişkilidir.¹⁷¹ Bazı çalışmalar periodontal inflamasyonun sistemik oksidatif strese rol oynayabileceğine dair kanıtlar göstermiştir. Farklı ülkelerden 16 çalışmayı içeren bir meta-analizde Liu ve ark.,¹⁷¹ kronik periodontitisli hastalarda sağlıklı bireylere göre serum TAS seviyelerinin daha düşük olduğunu, nitrik oksit ve MDA seviyelerinin daha yüksek olduğunu göstermiştir.

Ayrıca periodontal tedaviye yapılan klinik müdahale, periodontitisli hastalarda ROT'ların ve lipit peroksitlerin yüksek serum düzeylerini iyileştirmiştir.^{172,173} Bu sonuçlar, periodontitis kaynaklı ROT'ların ve oksidatif ürünlerin hematojen difüzyonunun sistemik oksidatif stresi indüklediğini göstermektedir. Ayrıca periferik kandaki PMNL'lerin aktivasyonu da dolaşımdaki ROT'ların artmasına neden olabilir. Matthews ve ark.¹⁷⁴ kronik periodontitis hastalarından toplanan periferik nötrofillerin in vitro ROT'ların üretimi ve salınımlarında artış gösterdiğini bulmuşlardır. Dias ve ark.¹⁷⁵

periodontitis hastalarının plazmasındaki artan inflamatuvar sitokinlerin (IL-8, interferon gama ve granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör dahil), sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında nötrofil süperoksit üretimini doğrudan uyarmada önemli ölçüde daha etkili olduğunu bildirmiştir.¹⁷⁶

Bu nedenle periodontitisle ilişkili sistemik oksidatif stres, karaciğerdeki oksidatif hasarda rol oynayabilir. Tomofuji ve ark.¹⁷⁷⁻¹⁷⁹ tarafından yapılan bir dizi hayvan çalışması, periodontal inflamasyonu takiben artan kan ROT'ların ve lipid peroksit heksanoil-lisinin sıçanların karaciğerindeki oksidatif DNA hasarı ve apoptozda rol oynadığını ortaya çıkardı. Diğer çalışmalar da sıçanlarda ligatür kaynaklı periodontitisin, hem kanda hem de karaciğerde bulunan MDA artışı ve antioksidan GSH üretiminin azalması yoluyla hafif karaciğer hasarına neden olduğunu bildirmiştir.^{9,176,180,181} Ayrıca, yüksek yağlı veya yüksek kolesterolü bir diyet ile birlikte periodontitis intrahepatik oksidatif stresi artırarak steatohepatitin alevlenmesine neden olmaktadır.^{13,182}

Araştırmalar periodontal inflamatuvar stresin çeşitli düzeylerde karaciğer fonksiyon bozukluklarına neden olarak NAYKH riskini arttırdığını göstermektedir.^{6,11,13,14} Popülasyona dayalı yapılan bir kohort çalışmasında Akinkugbe ve ark.,¹⁸³ sağlıklı periodonsiyuma sahip katılımcılarla karşılaştırıldığında periodontitis geçmişi olan katılımcılar arasında daha yüksek NAYKH insidans oranı olduğunu göstermiş ve periodontitis öyküsünün NAYKH için bir risk faktörü olabileceğini ileri sürmüştür. Widita ve ark.'nın¹⁸⁴ 72 yaşından büyük 265 Japon üzerinde yaptıkları bir kohort çalışmasında, başlangıçtan 8 yıl sonrasına kadar, periodontal muayeneyi de içeren sözlü muayeneleri yıllık olarak yapılmış, ayrıca kanda AST ve ALT ölçülmüştür. Yapılan analizde, ALT'nin periodontal parametrelerle önemli ölçüde ilişkili olduğu gösterilmiş, ancak AST ile herhangi bir korelasyon bulunamamıştır. Shin ve ark.¹⁸⁵ periodontal hastalık ile NAYKH arasındaki ilişkiyi değerlendirmeyi amaçladığı 11 yıllık kapsamlı bir

takip çalışmasında periodontitisin daha yüksek NAYKH insidansı ile ilişki gösterdiği bulunmuştur.

Iwasaki ve ark.'nın¹⁸⁶ yaptığı kesitsel çalışmada, ultrasonla teşhis edilen NAYKH ile $PPD \geq 4$ mm arasında pozitif bir ilişki olduğu bulunmuştur. Akinkugbe ve ark.¹⁸⁷ ABD'de yaşayan, Hispanik ve Latin kökenli insanlarda bir çalışma yapmış ve Meksika, Küba, Porto Riko, Dominik, Orta Amerika veya Güney Amerika etnik gruplarının herhangi birinde 3 mm veya daha fazla KAK yüzdesi veya 4 mm veya daha fazla SCD ile serum ALT veya AST düzeyleri ve yağlı karaciğer indeksi arasında anlamlı bir ilişki olmadığını göstermiştir. Bu sonuçlar periodontitis ile NAYKH arasında bir ilişkinin bazı etnik gruplarda bulunmayabileceğini düşündürmektedir.

2.5. Melatonin

2.5.1. Melatoninin Etki Mekanizmaları ve Fizyolojik Önemi

Melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin), esas olarak günün karanlık evresinde epifiz bezi tarafından üretilen ve salgılanan bir indoleamindir. Melatonin ritminin sadece gündüz-gece döngüsünün bir yansıması olmadığına, organizmanın içinde olduğuna ve muhtemelen suprakiazmal çekirdekten gelen döngüsel sinyallerden kaynaklandığına inanılmaktadır.¹⁸⁸ Işığın yanı sıra yaş da melatonin ritmini etkilemektedir.^{189,190}

Melatoninin birincil fizyolojik işlevi, günlük ışık ve karanlık döngüsüne ilişkin bilgileri vücut yapılarına iletmektir. Bağışıklık, antioksidan savunma, hemostaz ve glukoz regülasyonu gibi fizyolojik fonksiyonların sirkadiyen organizasyonu da melatonin sinyaline bağlıdır. Melatonin muhtemelen kronobiyotik özellikleri aracılığıyla tüm ritmik organizasyonu pekiştirmektedir.^{191,192} Melatoninin ileriye dönük etkileri yoluyla suprakiazmal çekirdeğin sirkadiyen süresini kontrol edebildiğine ve pankreatik β hücrelerinin, adacıkların ve metabolik açıdan en önemli dokuların (karaciğer, kas ve yağ

dokusu) melatoninin hedefleri olduğuna inanılmaktadır.¹⁹¹ Melatonin, enerji dengesinin, karbonhidrat ve adiposit metabolizmasının düzenlenmesinde önemli bir rol oynar.^{192,193}

Lakrimal bez, retina, eritrositler, trombositler ve gastrointestinal sistemdeki bazı hücrelerin de melatonin sentezlediği gösterilmiş olmasına rağmen bu sentezin plazma melatonin düzeyine etkisi çok azdır.¹⁴ Melatonin doğal bir nörotransmitterdir. Vücutta birçok biyolojik ve fizyolojik düzenlemelerde görev alır. İnsan biyoritimi (sirkadiyen ritim) üzerine etkili bir hormondur. Ana görevi vücudun biyolojik saatini koruyup ritmini ayarlamaktır. Hücrelerimizi yenileyici, bağışıklık sistemini düzenleyici, vücudumuzun biyolojik ritmini ayarlayıcı, anti-oksidan, yaşlanmayı geciktirici, büyüme hormonunu arttırıcı ve ergenliği başlatıcı özellikleri de vardır.¹⁵⁻¹⁷

2.5.2. Melatoninin Anti-inflamatuar Etkisi

Melatonin, reseptör etkileşimleri aracılığıyla anti-inflamatuar etkinlik gösterir. Melatonine özgü olarak farklı dokularda membran ve nükleer reseptörler tanımlanmıştır. Melatonin membran reseptörleri, G-protein reseptör süper ailesine ait ve fonksiyonel olarak iki aktif bölüme sahip olan MT1 (melatonin 1a) ve MT2 (melatonin 1b)'dir.^{194,195} Araşidonik asitten türetilen inflammatuar bileşiklerin, melatonin tarafından fosfolipaz A2, lipooksijenaz ve COX üzerinden MT1 ve MT2 reseptörleri aracılığıyla oluşumlarının azaldığı, hem hücre kültürlerinde hem de canlı organizmalarda kanıtlanmıştır.¹⁹⁴ Ayrıca, inflamasyon sürecinde, inflammatuar hücrelerin damar duvarına yaklaşmasını sağlayan adezyon moleküllerinden ICAM-1 ve p-selektinin serum seviyelerinin melatonin tarafından azaltıldığı saptanmıştır.^{194,196} Buna ek olarak, melatoninin, reseptör bağımlı ya da bağımsız yollarla, atipik hücrelerin apoptozunu artırdığı bildirilmiştir.¹⁹⁷ Ayrıca, melatoninin, RANK gibi inflamasyon, doğal bağışıklık, hücresel aktivasyon ve lenfosit aktivitesinin artmasında rol oynayan proteinlerin transkripsiyon faktörlerini düzenlediği

bulunmuştur.^{194,198} Lokal enjeksiyonla uygulandığında melatoninin, lipopolisakkaritle indüklemiş proinflamatuvar sitokinlerin (IL-2, TNF- α ve INF- γ) seviyelerini düşürdüğü gösterilmiştir.^{194,199} Aynı şekilde, bu uygulamanın anti-inflamatuvar sitokin olan IL-10'un lokal ve sistemik üretimini artırdığı tespit edilmiştir.^{194,200} Ayrıca, hayvan deneylerinde, eksojen melatoninin, IL-1 β ve TNF- α seviyelerini düşürüp, IL-4 seviyesini artırarak akut inflamatuvar yanıtı baskıladığı rapor edilmiştir.²⁰¹ Rat karaciğerine etanol uygulanarak oluşturulmuş proinflamatuvar sitokin artışı sonucu gelişen akut karaciğer hasarında, melatoninin doza bağlı olarak proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu azalttığı saptanmıştır.^{194,202} Deneysel periodontitis oluşturulmuş rat modellerinde ise, melatonin uygulamasının IL-1 β , TNF- α ve RANKL/OPG seviyelerini düşürerek periodontal doku yıkımını sınırlandırdığı gösterilmiştir.^{203,204}

2.5.3. Melatonin Kemik Metabolizması İlişkisi

Kemik metabolizması, osteoblast, osteoklast ve osteosit hücreleri, mineral döngüsü, hormonal ve çevresel faktörler tarafından düzenlenmektedir. Melatonin, esasen epifiz bezinden karanlıkta salınan bir molekül olmasına rağmen, kemik iliğinde de yüksek oranda bulunur ve kemik metabolizma hücreleriyle yakın ilişkisi ile antioksidan özelliği, kemik dokusunun yeniden şekillenme sürecinde kemik aposizyonunu etkileyebileceğini düşündürmektedir.^{205,206} Özellikle post-menopozal dönemde artan osteoporoz için kullanılan ilaçlara kıyasla daha düşük yan etki profiline sahip güvenli bir alternatif arayışı, melatoninin bu alanda kullanılabileceğini işaret etmektedir.^{205,207} Melatoninin kemik iliğinden salınması, kemik doku üzerinde lokal bir etki oluşturur.^{205,208} Canlı hücre kültürlerinde ve prelinik çalışmalarda, melatoninin osteoblastlar üzerinde doğrudan etkisi gözlemlenmiştir.^{205,209-211} Osteoblast farklılaşmasını ve proliferasyonunu artırmaktadır. Melatonin reseptörlerinden MT2'nin osteoblastogeneizde önemli rol oynayan BMP2 (bone morphogenic protein 2), osterix ve osteokalsini uyarak mitojen

aktive protein 41 kinaz (MAPK) yolunu aktif hale getirdiği bulunmuştur.²⁰⁵ Ayrıca, melatonin osteoblastlarda bulunan ve osteogenezde rol oynayan Wnt/ β -catenin sinyal yolunu da aktive etmektedir.^{205,212} Bunun yanı sıra, melatoninin kemik mineralizasyonu ve dayanıklılığı üzerinde önemli bir rol oynayan Tip 1 kollajen sentezini ve kemik kitlesini artırdığı saptanmıştır.²¹³ Osteoklastlar, esas olarak monosit koloni stimulan faktör (M-CSF), RANKL ve OPG tarafından düzenlenmektedir. Melatoninin osteoklastlar üzerinde doğrudan etkisi henüz kanıtlanmamış olsa da, OPG molekülünü artırarak osteoklast aktivitesini engellediği bilinmektedir.²¹⁴ Ayrıca, osteoklastlar kemik yıkımı sırasında yüksek miktarda süperoksit anyonu üretmektedir. Melatoninin serbest radikal süpürücü etkisi, osteoklastların kemik yıkımını azaltmakta ve kemik hücrelerini oksidatif hasara karşı korumaktadır. Periodontal kemik yıkımında oksidatif stresin rol oynadığı düşünüldüğünde, melatoninin periodontal kemik formasyonu üzerinde koruyucu bir etkisi olduğu bulunmuştur.²¹⁵

2.5.4. Melatonin ve Antioksidan Etkisi

Günümüzde, melatonin molekülünün serbest radikal süpürücü bir antioksidan olduğu kabul edilmektedir.²¹⁶ Diğer antioksidan moleküllerinden farkı, melatonin metabolitlerinin de oksijen radikallerini nötralize etme özelliğine sahip olmasıdır. Bu özelliğiyle melatonin, A ve E vitaminleri, glutatyon ve NADH gibi moleküllerden daha güçlü bir antioksidan olarak kabul edilmektedir.²¹⁶ Melatonin, direkt ve indirekt mekanizmalarla, oldukça aktif olan ROT ve reaktif nitrojen türlerinden (RNT) vücudu korumaktadır.²⁰¹ Serbest radikal süpürücü etkisi, endojen antioksidanların ve antioksidan enzimlerin uyarılmasıyla ortaya çıkmaktadır. Bunun yanı sıra, melatonin molekülü hücre mitokondrilerine yüksek oranda geçebilmekte ve mitokondrial redoks reaksiyonlarında önemli bir rol oynamaktadır.²¹⁷ Elektron transport zincirinde süperoksit anyonunu azaltarak doğrudan antioksidan etki göstermektedir.²¹⁷ Ayrıca, melatonin metabolitleri de

benzer şekilde serbest radikal süpürücü etkiye sahiptir.¹⁹⁴ ROT'un periodontal doku yıkımındaki rolü düşünüldüğünde, ROT oluşumunu baskılamak, periodontal hastalık tedavisindeki önemli hedeflerden biri haline gelmiştir. Periodontitis oluşturulmuş rat modellerinde, melatoninin, periodontitisin indüklediği oksidatif stresi azalttığı, inflamatuvar sitokin seviyelerini düşürdüğü ve antioksidan durumu artırdığı keşfedilmiştir.²⁰⁴ Ayrıca, randomize kontrollü bir çalışmada melatoninin, DOS'taki TAS'ı artırıp, MMP-9 seviyesini belirgin bir şekilde düşürdüğü gösterilmiştir.²¹⁸ P. gingivalisin, insan aort endotelinde oluşturduğu inflamatuvar yanıt ve oksidatif stres, metronidazol ile kombine melatonin uygulaması sonrasında önemli ölçüde gerilemiştir.²¹⁹ Tüm bu bulgular, melatoninin antioksidan özellikleriyle birçok hastalığın yıkım sürecini engelleyebileceğini ortaya koymaktadır.²¹⁶

2.5.5. Melatonin ve Antimikrobiyal Etkisi

Melatonin, endojen bir hormon olarak etkilerini anti-infektif yollarla da ortaya koymaktadır.²¹⁶ İn vitro çalışmalar, melatoninin *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* ve metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* türlerinin büyümelerini engelleyebileceğini göstermektedir.²²⁰ Antibakteriyel etkisini ise inflamatuvar sitokin üretimini baskılayarak ve bakterinin dokuya verdiği hasarın iyileşmesini hızlandırarak gösterdiği belirlenmiştir. Bu konuda periodontopatojenlerle yapılan sınırlı sayıda çalışma mevcuttur.²²¹⁻²²³ Srinath ve ark.,²²² melatoninin periodontal patojenler olan P. gingivalis, Streptococcus mutans ve Prevotella intermedia'ya karşı antimikrobiyal etkisini göstermişlerdir. Melatonin ve reseptör agonisti ramelteonun P. gingivalis üzerinde biyofilmi bozma ve inhibe etme gibi etkileri olduğu bildirilmiştir.²²⁴ P. gingivalis gibi inatçı türler üzerinde gösterdiği etki düşünüldüğünde, melatoninin anti-persister etkisinin ileride yeni araştırmalara konu olması beklenmektedir.²¹⁶

2.5.6. Melatonin ve Periodontitis

Periodontitis, konak yanıtı, birçok genetik ve çevresel faktörlerin yanı sıra çeşitli sistemik hastalıklar tarafından da modifiye edilir. DSÖ'nün 2023 yılında yayınladığı rehberde, şiddetli periodontal hastalıkların, küresel yetişkin nüfusun yaklaşık %19'unu etkilediği gösterilmiştir.²²⁵ Periodontal hastalıklarda oksidatif stresin rolü değerlendirildiğinde antioksidan ajanların periodontitiste faydalı olabileceği düşünülebilir.

Konak modülasyonu ajanı olan melatoninin periodontitis tedavisindeki rolü güncel bir araştırma alanıdır.²²⁶⁻²³⁰ Melatonin osteoblastik ve osteoklastik aktivitelerin modülasyonunda rol oynayarak kemik oluşumuna katkı sağlar, hücreleri serbest radikallerin yıkıcı etkilerinden korur.²³¹ Osteoklast olgunlaşmasında rol oynayan RANKL aktivasyonunu azaltarak kemik yıkımını engeller.²³² Ayrıca proinflamatuvar ve anti-inflamatuvar sitokinlerin modülasyonunu sağlayarak periodontal dokulardaki inflamasyonu hafifletebilir. Sonuç olarak, melatonin inflamatuvar hastalıkların tedavisinde immunoinflamatuvar yanıtın modülasyonunda değerli bir ajan olabilir.²⁰⁴

Melatoninin, epifiz bezi dışında gingival dokularda ve tükürük bezlerinde de salınımının gerçekleştiği bilinmektedir.²³³ Melatonin, antioksidan, anti-inflamatuvar, kansere karşı koruyucu, immün düzenleyici ve kemik metabolizmasında yapım faaliyetlerini artırıcı etkileri ile vücudun günlük döngüsünü düzenlemektedir.²³³ Melatonin, periodontitisin yıkım süreçlerinde, konak kaynaklı hücre ve sitokinlerin etkisiyle meydana gelen inflamasyon ve oksidatif stresin etkilerini azaltması açısından önemli bir molekül haline gelmiştir.²³⁴ Yapılan araştırmalarda, periodontitis gruplarında tükürükteki, DOS'taki ve gingival dokulardaki melatonin seviyelerinin sağlıklı kontrol gruplarına kıyasla düşük olduğu belirlenmiştir.²³⁵ Anti-inflamatuvar etkinliğini,

reseptörleri aracılığıyla pro-inflamatuar sitokin salınımını engelleyerek, bu protein yapıların transkripsiyonlarını kısıtlayarak ve adezyon moleküllerini etkileyerek göstermektedir.¹⁹⁴

Periodontitis tedavisine ek olarak, sistemik melatoninin oral yolla uygulandığı birçok çalışma bulunmaktadır.^{233,236} Bu çalışmalarda, melatonin uygulanan gruplarda klinik periodontal parametrelerden SCD, Gİ, periodontal hastalık indeksi ve gingival kanama indeksinde belirgin bir iyileşme gözlemlenmiştir.²³³ Özellikle 5 mm'nin üzerindeki periodontal ceplerde anlamlı bir fark görülmektedir.²³³ Sistemik melatonin uygulamasının tükürükteki TNF- α seviyesini ve sistemik dolaşımdaki IL-6, CRP, IL-1 β , MDA seviyelerini önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir.²³³ Serumda antioksidan kapasiteyi artıran süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz enzimlerinin, yine sistemik melatonin uygulanan gruplarda daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.^{233,237} Melatoninin periodontal dokuları da kapsayan genel etkileri, periodontal homeostazı koruyucu özellik göstermektedir.

Melatonin, vücut sıvılarına geçebildiği için ağız boşluğuna salındığında tükürük yoluyla periodontal dokular üzerinde koruyucu etkiler gösterebilir. Birçok çalışma, periodontal hastalıklar ile tükürükteki melatonin seviyeleri arasındaki ilişkiyi incelemiş ve tükürükteki melatonin seviyelerinin periodontal hastalığın şiddetiyle orantılı olarak değiştiği bulunmuştur.^{238,239} Hastalığın şiddeti arttıkça, tükürükteki melatonin seviyeleri düşer. Bu durum, melatoninin bakteriyel yükü engellemeye yardımcı olabileceğini gösterir. Topikal melatonin uygulanan gruplarda biyokimyasal incelemelerde DOS'ta IL-1 β , TNF- α , IL-6 ve CRP gibi pro-inflamatuar sitokinlerin belirgin ölçüde düşüş gösterdiği tespit edilmiştir.²³³ Topikal melatonin ile tedavi uygulanan bir çalışmada,²⁴⁰ Gİ skoru ve cep derinliğindeki azalma, tükürükteki RANKL seviyelerinin düşmesi ve OPG seviyelerinin artması ile ilişkilendirilmiştir. Bu bulgular, melatoninin osteoklastogenezi

yavaşlatarak, periodontal hastalığın ilerlemesinin engellenmesine katkı sağladığını düşündürmüştür.

Çeşitli hayvan çalışmaları da klinik çalışmaları destekler niteliktedir. Örneğin Kara ve ark.²⁰⁴ ratlarda deneysel periodontitis modeli oluşturmuş ve melatoninin periodontal dokularda oksidatif hasarı azalttığını bulmuşlardır. Başka çalışmada Köse ve ark.²³² sistemik melatonin uygulamasının deneysel periodontitisli ratlarda alveolar kemik rezorpsiyonu üzerine etkisini, biyokimyasal ve immunohistokimyasal analizlerle incelemiş ve melatoninin periodontal iyileşmeye katkıda bulunduğunu, alveolar kemik rezorpsiyonunu inhibe ettiğini bildirmiştir. Başka bir çalışmada deneysel periodontitis modeli oluşturulmuş diyabetik ratlarda melatonin uygulamasının, miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesi ve alveol kemiği yıkımı üzerine etkisinin yanı sıra, serum TOS, TAS ve OSI düzeyleri incelenmiş, sistemik melatonin uygulamasının diyabetin neden olduğu oksidatif stresi ve alveolar kemik kaybını önemli ölçüde sınırladığı bulunmuştur.⁷⁷

2.5.7. Melatonin ve NAYKH

Karaciğer, hepatositlerde oksidatif strese yol açabilen çok sayıda ROT'u detoksifiye etmede ana rolü oynar. Çünkü şiddetli oksidatif hasar karaciğer fonksiyonunu bozar. Son araştırmalar, karaciğeri hasardan koruyan ve hidroksil radikalini temizleyen güçlü bir endojen antioksidan görevi gören melatoninin rolünü doğrulamıştır.¹⁵ Sonuçlar melatoninin sıçanlarda karbon tetraklorürün neden olduğu hepatik fibrogenezi, oksidatif stres ve proinflamatuvar sitokin üretimini inhibe ederek iyileştirdiğini göstermektedir.²⁴¹ Altı hafta süreyle deri altına karbon tetraklorür enjekte edilen sıçanlarda, hepatik fibrotik değişiklikler, hidroksiprolin ve MDA seviyelerinin artışı, glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz seviyelerinin ise azalması gözlemlenirken, melatonin bu etkileri tersine çevirdi. Melatoninin, karaciğer dokusunda nükleer faktör-kappa B (NF-KB)

ekspresyonunu inhibe ettiği ve fibrotik sıçanlarda Kupffer hücrelerinden TNF- α ve IL-1 β gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimini azalttđđı gösterilmiştir.

Birçok insan çalışması NAYKH'da melatonin takviyesinin metabolik parametreler üzerindeki etkisini araştırmıştır.²⁴²⁻²⁴⁷ Celinski ve ark.²⁴⁸ yapmış olduğu 14 aylık takip çalışmasında melatoninin NAYKH'da pro-inflamatuvar sitokin seviyelerini önemli ölçüde azalttđđını ve lipid metabolizmasının bazı parametrelerini iyileştirdiğini göstermiştir. Cichoz ve ark.²⁴³ karaciğer biyopsisiyle NASH teşhisi koyulan 26-58 yaş aralığındaki 45 hastada yaptığı çalışmada, melatoninin NASH'li hastalarda proinflamatuvar sitokinlerin seviyesini azaltarak önemli etkiye sahip olduğunu ancak ALT üzerinde anlamlı bir etkiye sahip olmadığını bulmuşlardır. Gonciarz ve ark.²⁴⁵ NASH'li hastalarda kısa süreli melatonin tedavisinin karaciğer enzimleri üzerindeki yararlı etkisini araştırmayı amaçladığı çalışmada, 12 haftalık melatonin tedavisi alan hastalarda ortalama plazma ALT, AST ve GGT düzeylerinde anlamlı iyileşme olduğunu bildirmişlerdir. Pakravan ve ark.²⁴⁷ melatoninin NAYKH'da biyokimyasal parametreler üzerindeki etkilerini belirlemeyi amaçladığı çalışmada, melatoninin karaciğer enzimlerini plasebodan daha önemli ölçüde azalttđđını, bu nedenle NAYKH'da melatoninin etkili olabileceğini bulmuşlardır.

Bahrami ve ark.²⁴⁹ tarafından melatoninin NAYKH'na sahip olan hastaların tedavisine etkisinin araştırıldığı randomize, çift kör, plasebo kontrollü çalışma yapılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda, 12 hafta boyunca günde 6 mg melatonin uygulamasının, enzimler (AST, ALT), antropometrik faktörler (ağırlık, bel çevresi, karın çevresi), kan basıncı, serum leptin düzeyleri ve yağlı karaciğerin derecesi gibi NAYKH ile ilişkili bir dizi faktörü iyileştirdiğini bildirmişlerdir.²⁴⁸

2.5.8. Periodontitis, NAYKH ve Melatonin Arasındaki İlişki

Literatür incelendiğinde, periodontitis ilişkili NAYKH tedavisinde melatoninin koruyucu etkisini inceleyen çalışma bulunamadı. Ancak melatoninin periodontitis ilişkili muhtemel karaciğer hasarı üzerinde koruyucu etkinliğini inceleyen bir çalışma bulunmaktadır.²⁵⁰ Bu araştırmada, Gülle ve ark.²⁴⁹ LPS ile uyarılan sıçan modelinde karaciğer, böbrek ve akciğer hasarını ve bu hasarın tedavisinde melatoninin terapötik etkisini incelemişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda serum AST, ALT ve BUN seviyelerinin LPS grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca melatonin tedavisinin, deneysel periodontitis ile oluşturulan yükselmiş serum AST, ALT ve BUN düzeylerinde anlamlı bir azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir. Ancak, deney gruplarındaki serum AST, ALT ve BUN düzeylerindeki değişiklikler histolojik verilerdeki değişikliklerle ilişkili olmamakla beraber, hem LPS hem de LPS + melatonin grupları kontrol grubuna benzer yapısal özellikler göstermiştir.²⁴⁹

Bu bilgiler ışığında, bu deneysel periodontitis çalışması, NAYKH varlığında, sistemik melatonin uygulamasının antioksidan, anti-inflamatuar ve anti-rezorptif etkileri yoluyla, periodontitisin karaciğer dokusu üzerine olumsuz etkilerini iyileştirebileceği hipotezi temelinde planlandı.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırmanın deney protokolü, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi (RTEÜ) Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından incelenmiş ve 2024/47 sayılı etik kurul onayı

ile deney hayvanlarının yaşam kalitesini ve refahını etkileyebilecek faktörler düşünülerek etik kurul yönergelerine uygun şekilde yürütülmüştür. Bu çalışma, RTEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TSA-2025-1992 numaralı proje ile desteklenmiştir.

3.1. Deney Hayvanlarının Temin Edilmesi ve Barınması

Bu deneysel çalışma, RTEÜ Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan deney hayvanları, 250-300 gram (gr) ağırlığında, her grupta 8 hayvan olacak şekilde toplamda 48 adet Sprague Dawley cinsi dişi rat olarak seçilmiştir. Kullanılan tüm hayvanlar, Ulusal Bilimler Akademisi tarafından hazırlanan ve Ulusal Sağlık Enstitüleri tarafından yayımlanan "Laboratuvar Hayvanlarının Bakımı ve Kullanımı Kılavuzu"nda belirtilen şartlar doğrultusunda gerekli bakımları almıştır. Biyolojik ve fizyolojik olarak benzer özelliklere sahip bu hayvanlar, deney hayvanları ünitesinde hijyenik koşullar altında, $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ortam sıcaklığında, %58 bağıl nem oranına sahip, ışık periyodunun 6.00-19.00 saatleri arasında sağlandığı bir ortamda barındırılmıştır. Normal diyet ve yüksek yağlı yüksek kolesterolü (HFHC) diyetle beslenen ratların, besin içeriği Tablo 3.1 ve Tablo 3.2'de belirtilmiştir. Ayrıca, suya sınırsız erişimleri (ad libitum) sağlanmıştır.

Tablo 3.1. Diyet Modeli Standart pellet rat yemi (270 kcal / 100 gr, Bayramoğlu Yem, Erzurum, Türkiye)

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

Tablo 3.2. NAYK yemi (5322 kcal / 1000 gr, Arden, Yem Ankara, Türkiye)

BESİN YAPI TAŞLARI	Gr (%)	Kcal (%)
protein	20	14.4
Karbonhidrat	33	24
Yağ	35	61.60
Toplam		100
YEM İÇERİĞİ		
Kazein, 30 Mesh	200	800
Metiyonin	3	12
Corn Starch	110	440
Fruktoz	110	440
Sukroz	110	440
Selüloz, BW200	42	0
Mısır Yağı	25	225
Tereyağı	165	1485
Palm Yağı	160	1440
Mineral Mix S10026	10	0
DiCalcium Phosphate	13	0
Calcium Carbonate	5.5	0
Potassium Citrate, 1 H ₂ O	16.5	0
Vitamin Mix V10001	10	40
Choline Bitartrate	2	0
Kolesterol	15	0
Kolik asit	3	0
Toplam	1000	5322

Temin edilen ratların laboratuvar koşullarına adaptasyonu için 1 hafta beklenmiş ve ardından ratlar rastgele olarak altı gruba ayrılmıştır:

Grup 1: Kontrol grubu (Kontrol): Normal diyetle beslenen ve herhangi bir deneysel işlem uygulanmadan takip edilen ratlardan oluşur (n=8).

Grup 2: Non alkolik yağlı karaciğer grubu (NAYK): Yüksek yağlı/yüksek kolesterolü (HFHC) bir diyetle 9 hafta süre oral yolla beslenerek NAYK modeli oluşturulan ve 16 hafta boyunca bu şekilde beslenmeye devam eden ratlardan oluşur (n=8).

Grup 3: Deneysel periodontitis grubu (Dp): Oral bakterilere retansiyon sağlaması için, çift taraflı olarak alt 1. molar dişlerinin boynuna (kole) 4.0 ipek suturların subgingival-

paramarjinal konumda ligatür yerleştirilmesi yöntemi ile deneysel periodontitis oluşturulmuş ratlardan oluşur (n=8).

Grup 4: NAYK + deneysel periodontitis grubu (NAYK + Dp): Yüksek yağlı/yüksek kolesterolü (HFHC) bir diyetle 9 hafta süre oral yolla beslenerek NAYK modeli oluşturulduktan sonra²⁵¹, 11. Haftanın ilk gününde oral bakterilere retansiyon sağlaması için, çift taraflı olarak alt 1. molar dişlerinin boynuna (kole) 4.0 ipek suturların subgingival-paramarjinal konumda ligatür yerleştirilmesi yöntemi ile deneysel periodontitis oluşturulmuş 8 rattan oluşur.

Grup 5: NAYK + melatonin grubu (NAYK + Mel): Yüksek yağlı/yüksek kolesterolü (HFHC) bir diyetle 9 hafta süre oral yolla beslenerek NAYK modeli oluşturulan ratlardan oluşur (n=8). 16. Haftanın ilk gününden itibaren 14 gün boyunca diğer hayvan çalışmalarıyla benzer bir yöntemle günlük 10 mg/kg dozunda melatonin intraperitoneal enjeksiyonları yapıldı.^{77,251}

Grup 6: NAYK + deneysel periodontitis + melatonin grubu (NAYK +Dp + Mel): Yüksek yağlı/yüksek kolesterolü (HFHC) bir diyetle 9 hafta süre oral yolla beslenerek NAYK modeli oluşturulan ve oral bakterilere retansiyon sağlaması için, 11. Haftanın ilk gününde, çift taraflı olarak alt 1. molar dişlerinin boynuna (kole) 4.0 ipek suturların subgingival-paramarjinal konumda ligatür yerleştirilmesi yöntemi ile deneysel periodontitis oluşturulmuş ratlardan oluşur (n=8). 16. haftanın ilk gününden itibaren 14 gün boyunca diğer hayvan çalışmalarıyla benzer bir yöntemle^{77,252} günlük 10 mg/kg dozunda melatonin intraperitoneal enjeksiyonları yapıldı.

3.2. Ligatür ile Periodontitis İndüksiyonu

Deneysel periodontitis modelinin oluşturulması için, hayvanlara intraperitoneal olarak ksilazin hidroklorid (Rompun, Bayer, İstanbul, Türkiye) 10 mg/kg ve ketamin

hidroklorid (Ketalar, Pfizer, İstanbul, Türkiye) 40 mg/kg enjeksiyonları ile anestezi uygulanmıştır. Gerekli durumlarda, başlangıç dozunun %20'si aralıklı olarak tekrar edilmiştir. Ardından, sağ ve sol alt 1. molar dişlerin servikal bölgelerine, sub-paramarjinal pozisyonda 4.0 ipek suture geçirilmiş ve suture, mezial tarafta düğümlenerek 5 hafta boyunca yerinde muhafaza edilerek deneysel periodontitis oluşturulmuştur. Suture, yapısı ve pozisyonu nedeniyle plak birikimine, inflamatuvar değişikliklere ve dolayısıyla periodontitis gelişimine zemin hazırlamıştır (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1 Periodontitis Modeli Oluşturulması

3.3. Melatonin Uygulanması

Melatonin (Alfa Aesar GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Almanya), %0.01'lik serum fizyolojik-etanol çözeltisi içinde taze olarak çözündürülmüş ve vorteksenerek hazırlanmıştır. Önceki çalışmalara benzer şekilde, 16. haftanın ilk gününden itibaren, 14 gün süreyle her gece saat 11:00'de, 10 mg/kg'lık tek doz intraperitoneal olarak insulin enjektörüyle uygulanmıştır.^{252,253} Kontrol, NAYK, Dp ve NAYK + Dp gruplarında ise aynı metodolojiyle salin uygulaması yapılmıştır. Deney öncesinde ve deney süresince,

ratların ağırlıkları periyodik olarak ölçülmüş ve hayvanların değişen ağırlıklarına göre tartı (Amput Electronic Technology Co., Shenzhen, Guangdong, Çin) kullanılarak melatonin doz ayarlamaları yapılmıştır. Deneyin 18. haftasının ilk gününde, 50 mg/kg sodyum pentobarbital enjeksiyonu ile derin anestezi altında tüm ratlar kurban edilmiştir. Histolojik, biyokimyasal ve radyolojik analizler için kurbanıktan önce kan örnekleri alınmış, kurbanıktan sonra ise doku örnekleri toplanmıştır.

3.4. Örneklerin Toplanması ve Hazırlanması

18. haftanın ilk gününde tüm gruplarda yukarıda açıklanan şekilde tekrar anestezi sağlanmış ve 10 ml'lik enjektörlerle intrakardiyak sol ventriküler kan örnekleri toplanmıştır. Toplanan kan örnekleri, +4°C'de 1739 g'de 15 dakika süreyle santrifüj edilerek serum örnekleri elde edilmiştir. Elde edilen kan serumları (süpernatantlar) eppendorf tüplerine konularak, analiz edileceği güne kadar -80°C'deki derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. Kan örnekleri alındıktan hemen sonra, öldürücü dozda sodyum pentobarbital enjeksiyonu (50 mg/kg) ile ötenazi uygulanmıştır (Ötenazi: SMK). Periodontal incelemeler için 1. molar dişleri içeren mandibular dokular, çevresindeki dokularla birlikte çıkarılmıştır. Karaciğerdeki yapısal değişikliklerin değerlendirilmesi amacıyla karaciğer diseke edilmiştir. Çalışmalar soğuk zincirde (buz üzerinde) gerçekleştirilmiştir. Karaciğer dokuları da çalışılncaya kadar -80°C'de saklanmıştır. Ötenaziden önce hayvanların ağırlığı ölçülüp, işlemten sonra karaciğerler tartılmıştır.

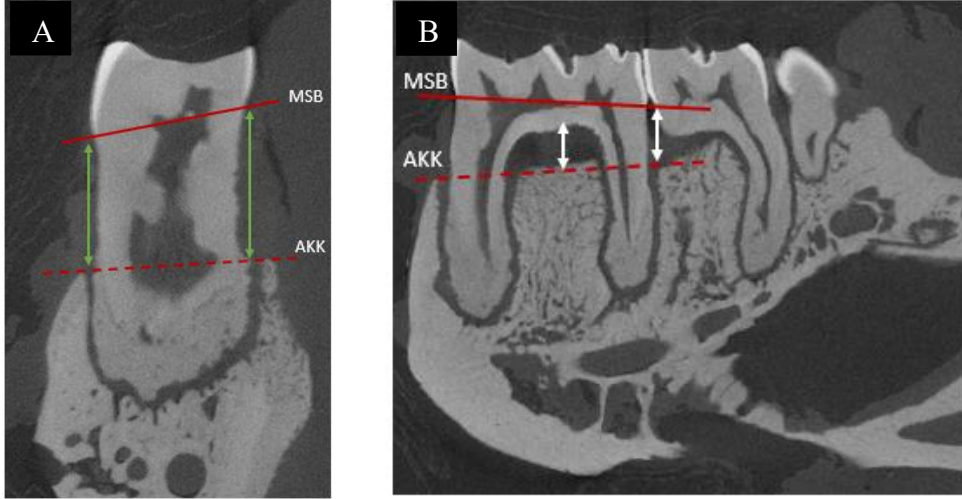
Sağ mandibula ve karaciğer örnekleri histolojik ve immünohistokimyasal analizler için %10'luk nötr formaldehit solüsyonuna yerleştirilmiştir. Mikrobilgisayarlı tomografik değerlendirmeler için sol alt çene diseke edilerek saklanmıştır. Alınan alt çene ve karaciğer dokuları çalışılncaya kadar -80°C'de saklanmıştır. Ayrıca karaciğerin NAYKH aktivite skoru (NAS) Kleiner ve ark.'nın tanımına uygun olarak H-E boyama görüntüsü üzerinde değerlendirilmiştir.¹³¹Toplam NAS, her bir sıçanda steatoz,

inflamasyon ve hücre hasarından (balonlaşma) oluşan üç skorun toplamı olarak hesaplanmış ve grup içi skorların ortalamaları standart sapma cinsinden gösterilmiştir. Karaciğer dokuları, soğuk fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkandıktan sonra, hızlı bir şekilde filtre kağıdıyla nemleri alınmış ve biyokimyasal analizler için -80°C dondurucuya aktarılmıştır. Hem histolojik hem de biyokimyasal incelemeler, çalışma grubu tayininden habersiz iki uzman araştırmacı tarafından gerçekleştirilmiştir (Biyokimya: SMK, AY; Histoloji: TM).

3.5. Radyomorfometrik Analizler

Sakrifiye edilen ratlardan elde edilen sol mandibula doku örnekleri molar dişler bölgesini kapsayacak şekilde trimlendi. Dokular plastik tüpler içerisine pamukla konumlandırıldı. Radyolojik inceleme sırasında alveolar kemiğin morfolojisindeki değişiklikleri incelemek için mandibulalar, μ BT Nikon XT H 225 (Nikon Metrology, UK) cihazı (104 kV, 145 μ A) kullanılarak tarandı. Her bir örnekten toplamda 800-1000 kesit alındı. Elde edilen DICOM (Digital Imaging and Communication in Medicine) uyumlu görüntüler, BMP (Bit Map Picture) formatına dönüştürüldü.

Alveolar kemik kaybı bukkolingual (koronal) ve meziodistal (sagittal) kesitlerde ölçüldü. Distal kökün distal kısmında mine-sement birleşimi (MSB) ile alveolar kemik kreti (AKK) arasındaki mesafe ve furkasyon çatısı (FÇ) ile alveolar kemik kreti arasındaki mesafeler kaydedildi.^{252,253} Bukkolingual değerlendirme için distal kök bölgesinden beş kesit alındı ve bu kesitlerden elde edilen ölçümlerin ortalaması alındı (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. MSB ve AKK arasındaki mesafenin radyografik ölçümü

A. Bukkal ve lingual yönlerden MSB ve AKK arasındaki mesafenin radyografik ölçümü

B. Furkasyon çatısı ile AKK ve distal köklerin distal tarafındaki MSB ve AKK arasındaki mesafenin radyografik ölçümü

MSB: mine-sement birleşimi, AKK: alveoler kemik kreti

3.6. Biyokimyasal Analizler

3.6.1. Analizlerde Kullanılan Araç Gereçler

Biyokimyasal analizler için RTEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı ve Rize Devlet Hastanesi Acil Servisi Laboratuvarında bulunan cihazlar kullanılmıştır (Tablo 3.3). ELISA kitleri ve çalışmada kullanılan sarf malzemeler (Tablo 3.3), TSA-2025-1992 no'lu normal araştırma projesi (NAP) kapsamında satın alınmıştır.

Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan cihazlar ve markaları

Cihaz Adı	Markası
Soğutmalı Santrifüj	Heraus 3SR+ Multifuge
Otomatik Pipetler	Eppendorf, Socorex, Brand
Mikrosantrifüj	Beckman Coulter
Vorteks	Velp Scientifica
Yatay Karıştırıcı	Selectr Movil-Rod
Distile Su Cihazı	Sartorius Arium 61316
Manyetik Karıştırıcı	Wisestir Msh
Etüv	MEMMER UF55
ELISA Okuyucu	Thermo Multiscan Go
ELISA Yıkayıcı	Biotek EL X 50
-80 Derin Dondurucu	Newbrunswick Scientfic
Buzdolabı	Beko BK 7121 T
pH metre	Hanna HI2210
Balon joje, mezür, beher gibi çeşitli cam malzemeler	Iso Lab
Ependorf	Iso Lab
Çeşitli hacimlerde pipet uçları	Iso Lab
Hassas Terazî	Precisa XB 220A
Otoanalizör	AU680 Beckman Coulter

3.6.2. Analizlerde Kullanılan Kimyasallar, Kitler ve Markaları

Yapılan analizlerde kullanılan kimyasallar, kitler ve markaları Tablo 3.4'te sunulmuştur.

Tablo 3.4. Çalışmada kullanılan kimyasallar, kitler ve markaları

Kimyasalın Adı	Markası
Di sodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4)	HIMEDIA
Sodyum Dihidrojen Fosfat (NaH_2PO_4)	HIMEDIA
Potasyum Klorür (KCl)	HIMEDIA
Sodyum Klorür (NaCl)	MERCK
Ditiyobis 2-nitrobenzoik asit (DTNB)	SİGMA
Tri sodyum sitrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$)	MERCK
Redükte glutatyon (GSH)	SİGMA-ALDRİCH
Asetik asit	MERCK
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Sigma-Aldrich
Tiyobarbitürik asit (TBA)	MERCK
Etanol	Iso Lab
1,1,3,3 Tetrametoksipropan (TEP)	FLUKA
Sodyum Klorür (NaCl)	MERCK
Hidrojen Klorür (HCl)	MERCK
RAT İnterlökin-1 β (IL-1 β)	Elabscience (E-EL-R0012)
RAT Tümör Nekroz Faktör- α (TNF- α)	Elabscience (E-EL-R2856)
RAT İnterlökin-6 (IL-6)	Elabscience (E-EL-R0015)
RAT Adiponektin (ADP/Acrp30)	Elabscience (E-EL-R3012)
RAT Leptin (LEP)	Elabscience (E-EL-R0582)
Toplam Antioksidan Seviye (TAS)	Rel Assay
Toplam Oksidan Seviye (TOS)	Rel Assay

3.6.3. Doku ve Kan Örneklerinin Toplanması

3.6.3.1. Doku Örneklerinin Toplanması

Deneyin sonunda sıçanlar ketamin (100 mg/kg, ip) ve rompun (10 mg/kg, ip) kombinasyonu ile uyuşturuldu. Anestezi derinliğini kontrol etmek için arka ayak pense ile sıkıldı. Anestezi altında sakrifiye edilen sıçanların karaciğer dokusunun bir kısmı %0,9'luk soğuk (+4°C) NaCl ile yıkanıp kurutma kağıdı ile kurutulduktan sonra dokular porsiyonlar halinde çalışmalar yapılana kadar -80°C'de saklandı. Ayrıca eksize edilen karaciğer dokusunun diğer bir kısmı histopatolojik ve immunokimyasal analizler için %10 formaldehit solüsyonuna koyuldu.

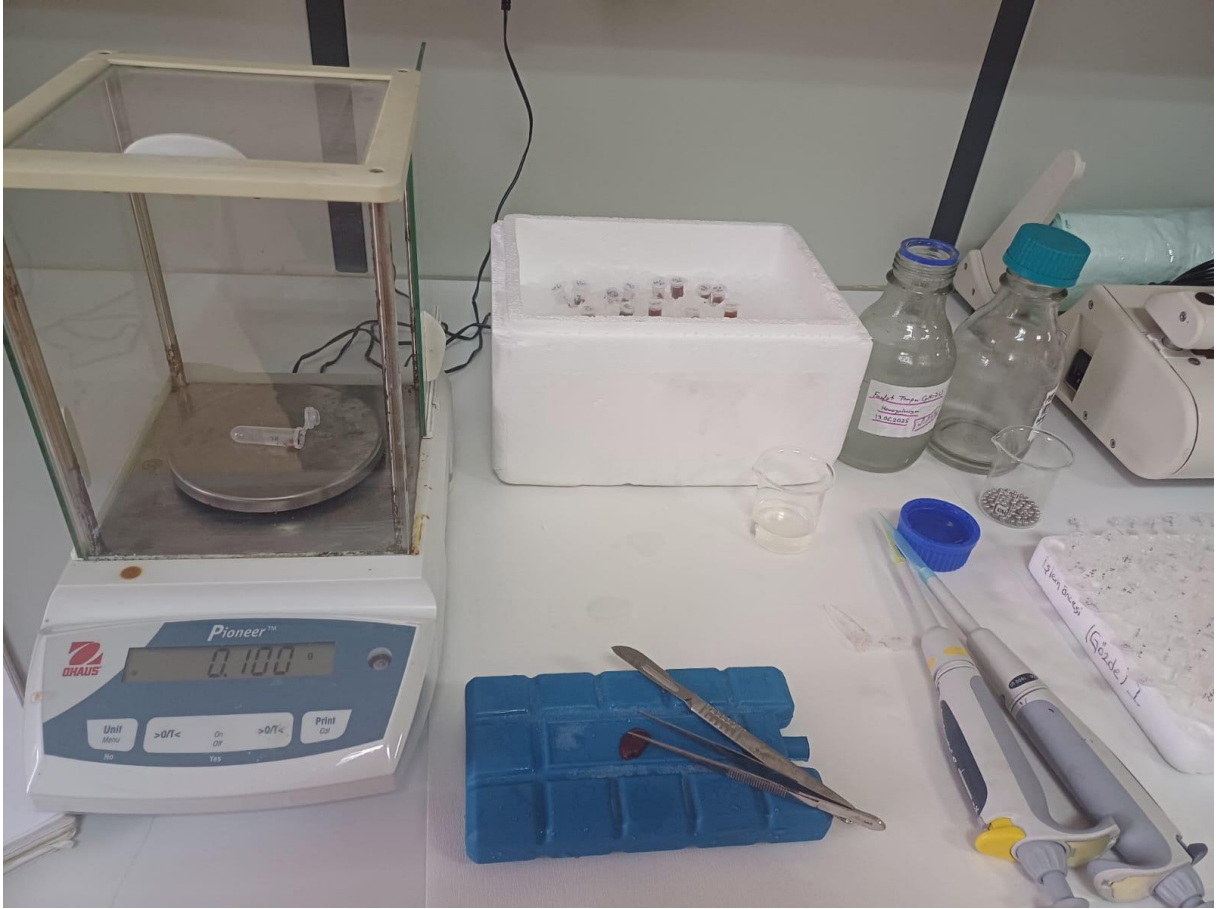
3.6.3.2. Kan Örneklerinin Toplanması

Sıçanlardan intrakardiyak yolla alınan kan örnekleri, antikoagülan içermeyen tüplere aktarıldı ve alınan kan örnekleri fibrin oluşması için oda sıcaklığında ortalama bir saat bekletildi. Örnekler daha sonra 2-8°C'de 15 dk boyunca 3500 rpm'de santrifüj edildi. Elde edilen serumlar (süpernatantlar) aligotlanarak ependorflara koyuldu ve numuneler biyokimyasal parametreler çalışılana kadar RTEÜ Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı'nda bulunan -80°C'de saklandı. Çalışmanın yapılacağı günden 24 saat önce ependorflar -80°C derin dondurucudan çıkartılarak, kademeli olarak sırasıyla -20°C ve ardından +4°C'de çözünmeleri sağlandı, serumlar çalışılacağı gün oda sıcaklığına çıkarıldı, vorteksenerek homojen hale gelmeleri sağlandı.

3.6.4. Karaciğer Dokularının Homojenizasyonu

20 mM 1L sodyum fosfat + 140 mM potasyum klorür ile homojenizasyon tamponu hazırlandı (pH 7,4).²⁵⁴

Karaciğer dokuları soğuk PBS tamponunda (pH=7,4) yıkandı ve fazla su uzaklaştırıldı, ardından dokular tartıldı (Şekil 3.3). Karaciğer dokuları üzerine homojenizasyon tamponu (doku ağırlığı (g): PBS (mL) hacim=1:9) eklenerek homojenizasyon cihazında (QIAGEN Tissue Lyser II) homojenize edildi (Şekil 3.3) ve homojenatlar 4°C de 12.000 rpm’de 15 dk santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlar biyokimyasal parametrelerin tayininde kullanıldı.



Şekil 3.3 Karaciğer Dokuların Homojenizasyonu

3.6.4.1 TBARS Tayini

TBARS tayini Ohkawa vd.’nin modifiye yöntemine göre yapıldı. Yöntemin prensibi; lipid peroksidasyonu ürünü MDA’nın, tiyobarbitürik asit (TBA) çözeltisi ile ısıtılması sonucu pembe renkli kompleks oluşturmasına dayanır.⁷⁵

TBARS Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler

%8,1'lik SDS→4,05 g SDS tartıldı, saf su ile çözülerek son hacmi 50 mL'ye tamamlandı.

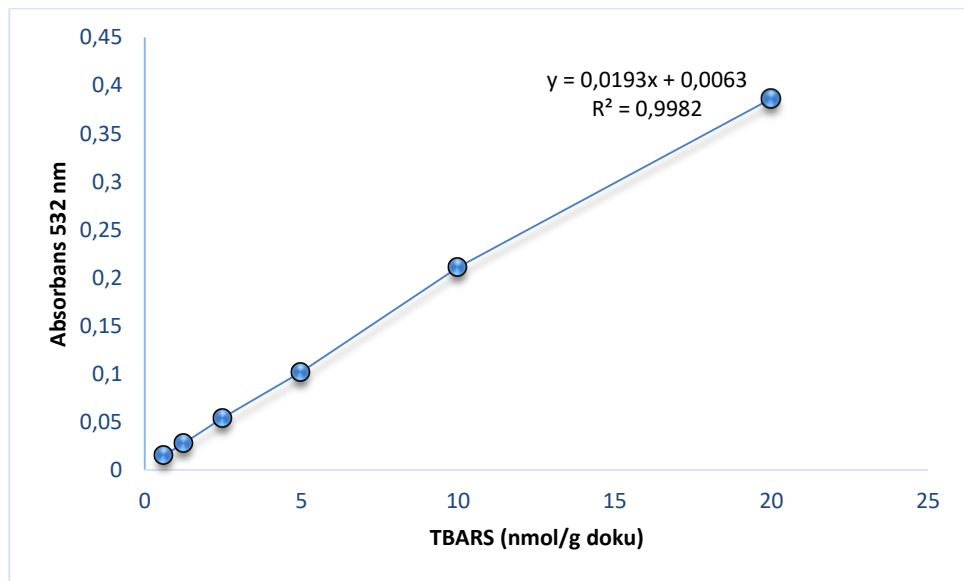
%50'lik Asetik Asit→25 mL asetik asit saf suda çözülerek son hacmi 50 mL'ye tamamlandı.

%0,8'lik TBA→0,2 g TBA, %50'lik Asetik Asit çözeltisinde çözülerek son hacmi %50'lik asetik asit ile 25 mL'ye tamamlandı.

%20'lik Asetik Asit→ 10 mL asetik asit 40 mL saf suda çözülerek pH'ı 3,5 olacak şekilde ayarlandı ve son hacmi 50 mL'ye tamamlandı.

Deneyin Yapılışı

Kör, standartlar ve süpernatantlardan 200 µL pipetlenerek üzerine 50 µL %8,1'lik SDS, 375 µL %20'lik asetik asit (pH=3.5), ve %0,8'lik 375 µL TBA eklendi. Karışım vortekslendi ve ardından çalkalamalı kaynar su banyosunda 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında 5 dk buzlu suda soğutuldu ve 750 g de 10 dk santrifüj edildi. Oluşan pembe renk 532 nm'de spektrofotometrede okutularak standart grafiği çizildi ve standart grafiği yardımıyla konsantrasyonlar hesaplandı (Şekil 3.4). Sonuçlar nmol/g doku olarak hesaplandı.



Şekil 3.4. TBARS standart grafiği

3.6.4.2 Toplam Tiyol (TT) Gruplarının Tayini

Toplam Tiyol gruplarının tayini, serbest sülfidril gruplarının Ellman reaktifiyle oluşturduğu sarı rengin spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanmaktadır.²⁵⁵

TT Gruplarının Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler

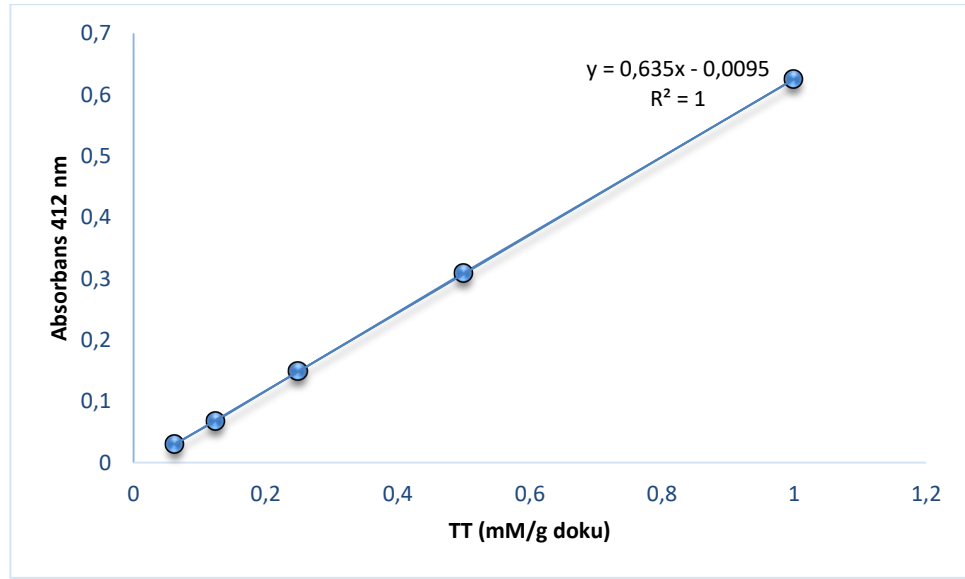
0,3 M Na₂HPO₄: 2,13 g Na₂HPO₄ tartıldı, saf su ile çözülerek son hacmi 50 mL'ye tamamlandı.

%1' lik sodyum sitrat: 0,5 g sodyum sitrat tartıldı, saf suda çözülerek son hacmi 50 mL'ye tamamlandı.

Ellman Ayıracı: 0,004 g DTNB tartıldı, %1' lik sodyum sitrat çözeltisinde çözülerek son hacmi yine %1'lik sodyum sitrat çözeltisi ile 10 mL'ye tamamlandı.

Deneyin Yapılışı

25 µL pipetlenen kör, standart ve süpernatantların üzerine 100 µL 3M Na₂HPO₄ ve 25 µL DTNB eklendi. Ardından hafif bir çalkalama sonrasında oluşan sarı renk 412 nm'de spektrofotometrede okutularak standart grafiği çizildi ve standart grafiği yardımıyla konsantrasyonlar hesaplandı (Şekil 3.5). Sonuçlar mM/g doku olarak hesaplandı.



Şekil 3.5. TT standart grafiği

3.6.4.3. Doku IL-6, IL-1 β , Leptin, Adiponektin ve TNF- α Düzeylerinin

Belirlenmesi

Homojenize edilen karaciğer dokularından elde edilen süpernatantlar RTEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Araştırma ve Uygulama Laboratuvarında enzime bağlı immünosorban yöntem (ELISA) ile Rat İnterlökin-1 β (IL-1 β , Kat. No: E-EL-R0012), Rat Tümör Nekrozis Faktör- α (TNF- α , Kat. No: E-EL-R2856), Rat İnterlökin-6 (IL-6, Kat. No: E-EL-R0015), Rat Adiponektin (ADP/Acrp30, Kat. No: E-EL-R3012) ve Rat Leptin (LEP, Kat. No: E-EL-R0582) Elabscience ticari kitleri kullanılarak gerçekleştirildi.

Kitlerin Prensibi: Sandwich-ELISA prensibine dayanır. Bu kitte bulunan mikropılaka, ölçülecek parametreye özgü bir antikor ile önceden kaplanmıştır. Numuneler (veya Standartlar) mikropılakanın kuyucuklarına eklenir ve spesifik antikor ile birleştirilir. Ardından, kite özgü biyotinile edilmiş bir tespit antikor ve Avidin Horseradish Peroxidase (HRP) konjugatı her mikropılaka kuyucuğuna sırayla eklenir ve inkübe edilir. Serbest bileşenler yıkanarak uzaklaştırılır. Substrat çözeltisi her kuyucuğa eklenir. Biyotinile edilmiş tespit antikor ve Avidin-HRP konjugatı içeren kuyucuklar mavi renk alır.

Enzim-substrat reaksiyonu, durdurma çözeltisinin eklenmesiyle sonlandırılır ve renk sarıya döner. Optik yoğunluk (OD) spektrofotometrik olarak 450 nm dalga boyunda ölçülür. Numunelerin OD'si oluşturulan standart grafik ile karşılaştırılarak IL-6, IL-1 β , LEP, ADP ve TNF- α konsantrasyonları hesaplanır.

Reaktiflerin Hazırlaması

Yıkama Solüsyonu: 30 mL konsantre yıkama solüsyonu, 720 mL distile su ile dilüe edilerek yıkama solüsyonu hazırlandı.

Standartların Hazırlanması: Tüm kitler için, kitin içerisinde bulunan standart 10.000 $\times$ g'de 1 dk santrifüjlendi. 1 mL Referans Standart ve Numune Seyreltici eklendi, 10 dk bekletildi, birkaç kez hafifçe karıştırıldı ve pipetaj yapıldı. Ardından seri dilüsyon yapılarak standart serileri hazırlandı (Şekil 3.6). Son tüp boş olarak kabul edilir. Önceki tüpten son tüpe çözelti pipetlenmedi.



Şekil 3.6. Standartların hazırlanması

Biotinile edilmiş Tespit Ab çalışma çözeltisi: Konsantre biyotinile edilmiş tespit Ab 800 $\times$ g'de 1 dk santrifüjlendi, ardından 100 $\times$ konsantre biyotinile edilmiş tespit Ab

biyotinile edilmiş tespit Ab seyreltici ile $1\times$ çalışma çözeltisi ile seyreltildi (konsantre biyotinile edilmiş tespit Ab: biyotinile edilmiş tespit Ab seyreltici = 1: 99).

HRP Konjugat çalışma çözeltisi: Konsantre HRP Konjugatı 800×g'de 1 dk santrifüjlendi, ardından 100×Konsantre HRP Konjugatı, HRP Konjugat Seyreltici ile $1\times$ çalışma solüsyonu ile seyreltildi (Konsantre HRP Konjugat: HRP Konjugat Seyreltici= 1: 99).

Biotinile edilmiş Tespit Ab çalışma çözeltisi ve HRP konjugat çalışma çözeltisi kullanımdan hemen önce taze olarak hazırlandı.

Kitlerin Çalışma Prosedürü

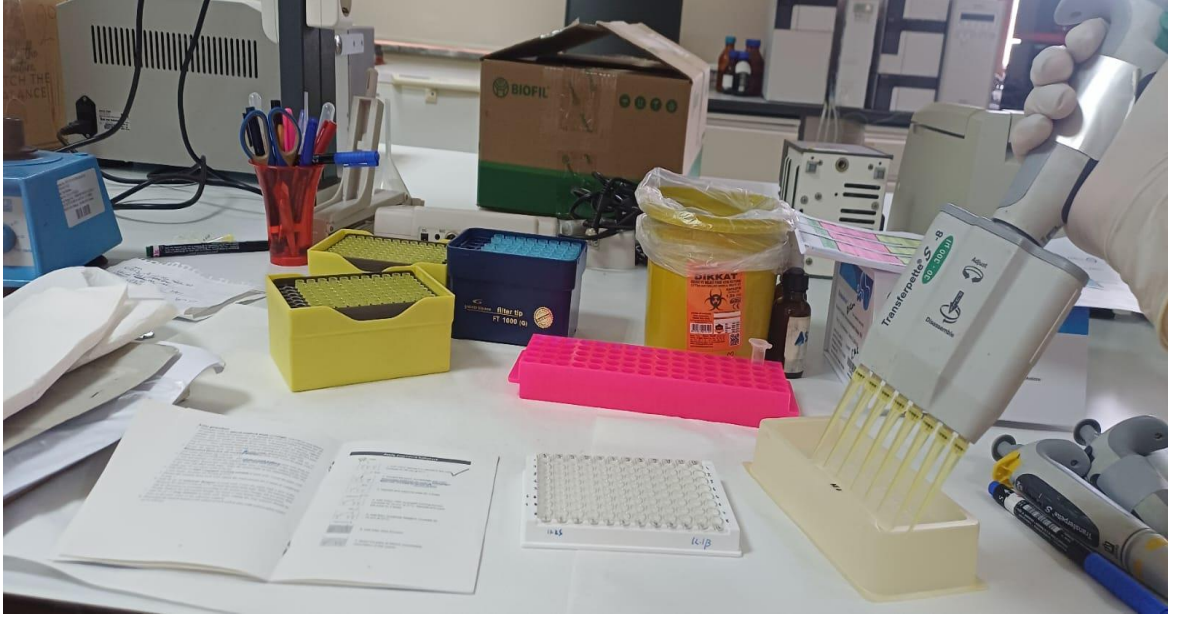
1. Tüm reaktifler, standartlar, mikrolaka ve numuneler oda sıcaklığına getirildi (Şekil 3.7).



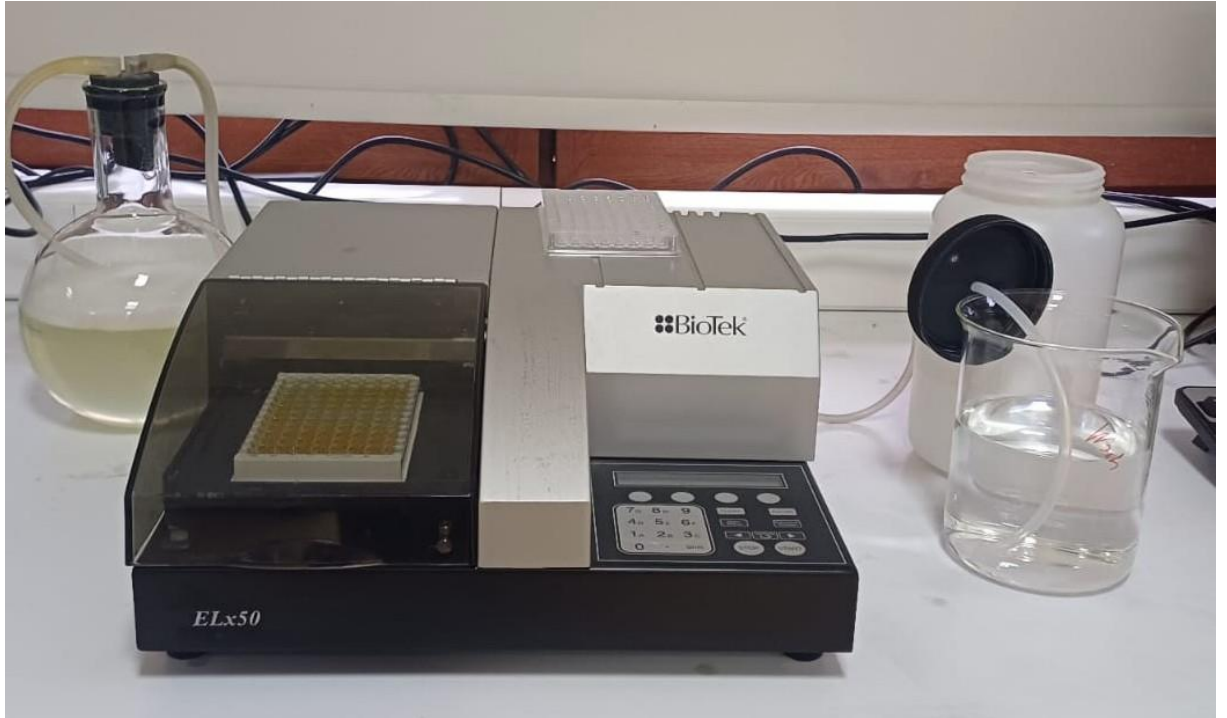
Şekil 3.7. Kit ve numunelerin oda sıcaklığına getirilmesi

2. Standartlar, blank ve numuneler kuyucuklara 100 μ l eklendi, mikrolakanın üstü kapatıldı, ardından 37°C'de 90 dk inkübasyona bırakıldı.

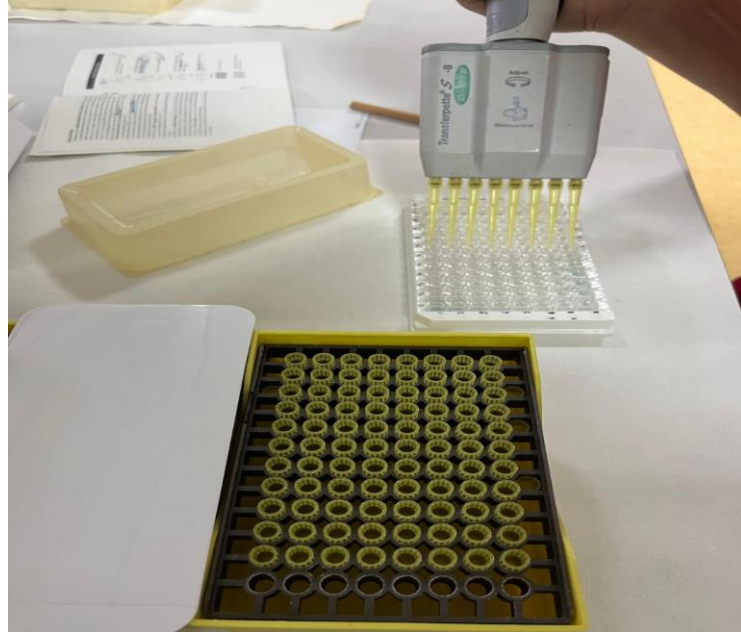
3. Her kuyucuktan yıkanma yapmadan sıvılar boşaltıldı. Hemen her kuyucuğa 100 µL Biotinylated Detection Ab çalışma çözeltisi eklendi. Plakanın üstü kapatıldı ve 37°C'de 60 dk inkübe edildi (Şekil 3.8).
4. İnkübasyon sonrasında mikrolaka, hazırlanan yıkama solüsyonundan 350 µl eklenerek ELISA yıkama cihazında (Biotek ELx50, ABD) 3 kez yıkandı. Ardından temiz emici kağıtla kurulandı (Şekil 3.9).
5. Tüm kuyucuklara 100 µL HRP Konjugat çalışma çözeltisi eklendi ve üstü kapatıldı. 37°C'de 30 dk inkübe edildi (Şekil 3.10).
6. 4. adımda yapıldığı gibi yıkama işlemi 5 kez tekrarlandı.
7. Her kuyuya 90 µL Substrat Reaktifi eklendi ve üstü kapatıldı. Karanlıkta 37°C'de yaklaşık 15 dk inkübe edildi.
8. Her kuyucuğa 50 µL stop solüsyonu eklendi. Mikrolaka okuyucuda (Thermo Scientific, Multiskan GO, ABD) 450 nm'de okutularak absorbanslar belirlendi. Stop solüsyonu eklerken maviden sarıya dönen renk değişikliği izlendi (Şekil 3.11).
9. Kit içerisinde bulunan standartların konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans değerleri ile oluşturulan IL-6, IL-1β, Leptin, Adiponektin ve TNF-α standart grafikleri kullanılarak numunelerin konsantrasyonları hesaplandı (Şekil 3.12).



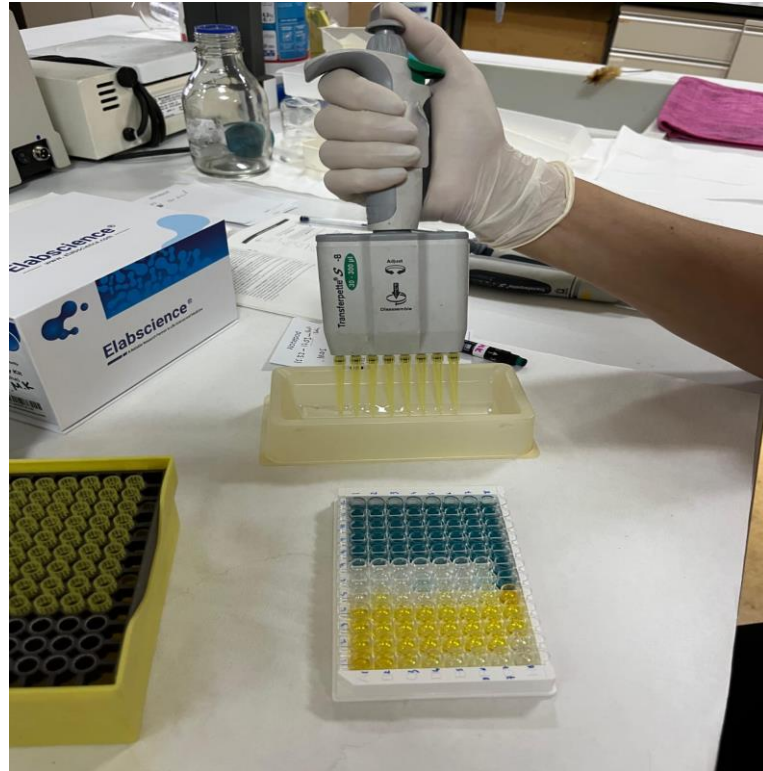
Şekil 3.8. Biotinylated Detection Ab çalışma çözeltisi ekleme aşaması



Şekil 3.9. ELISA BioTek ELx50 otomatik yıkayıcı ile yıkama aşaması



Şekil 3.10. HRP Konjugat ekleme aşaması



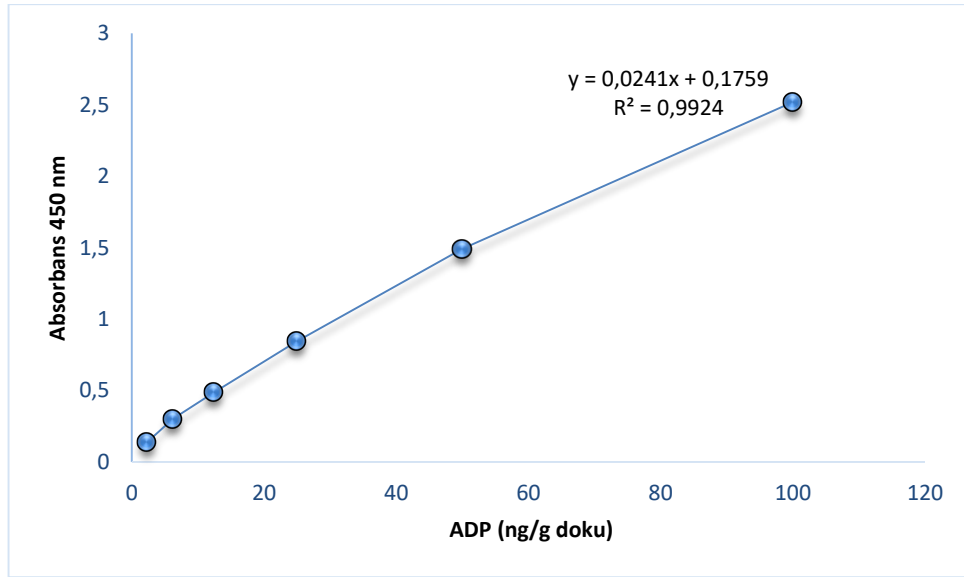
Şekil 3.11. Stop solüsyon ekleme aşaması (renk maviden sarıya döner)



Şekil 3.12. Thermo Scientific, Multiskan GO cihazında mikrolakanın okunması, standart grafiklerin çizimi ve sonuçların hesaplanması

Doku Adiponektin Seviyelerinin Tayini

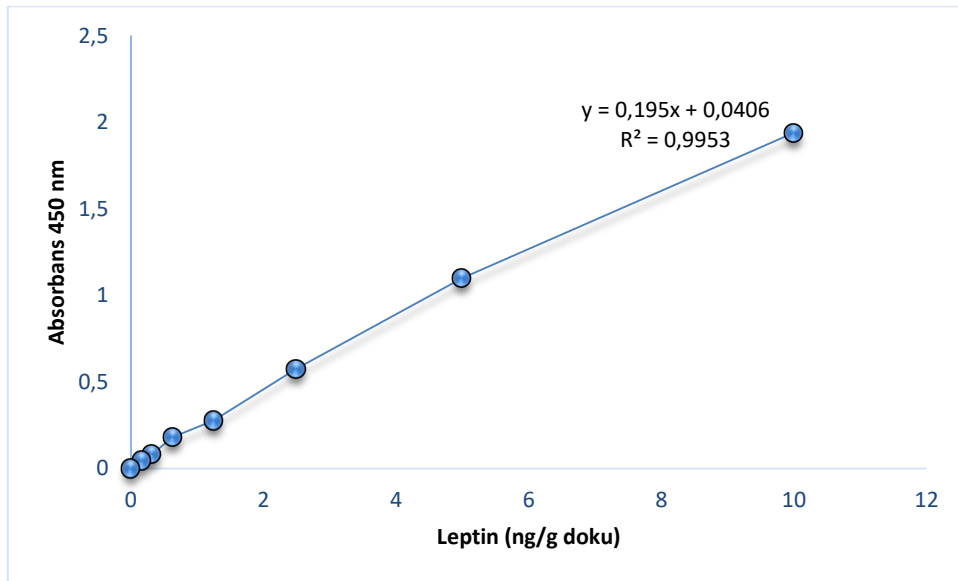
Doku Adiponektin seviyeleri enzime bağlı immünosorban yöntem (ELISA) Rat Adiponektin (Elabscience, Kat. No: E-EL-R3012) ticari kiti kullanılarak ölçüldü. Sonuçlar; 450 nm’de spektrofotometrik okuma yapılarak, oluşturulan standart grafik aracılığıyla ng/g doku olarak hesaplandı (Şekil 3.13).



Şekil 3.13 Adiponektin standart grafiği

Doku Leptin Seviyelerinin Tayini

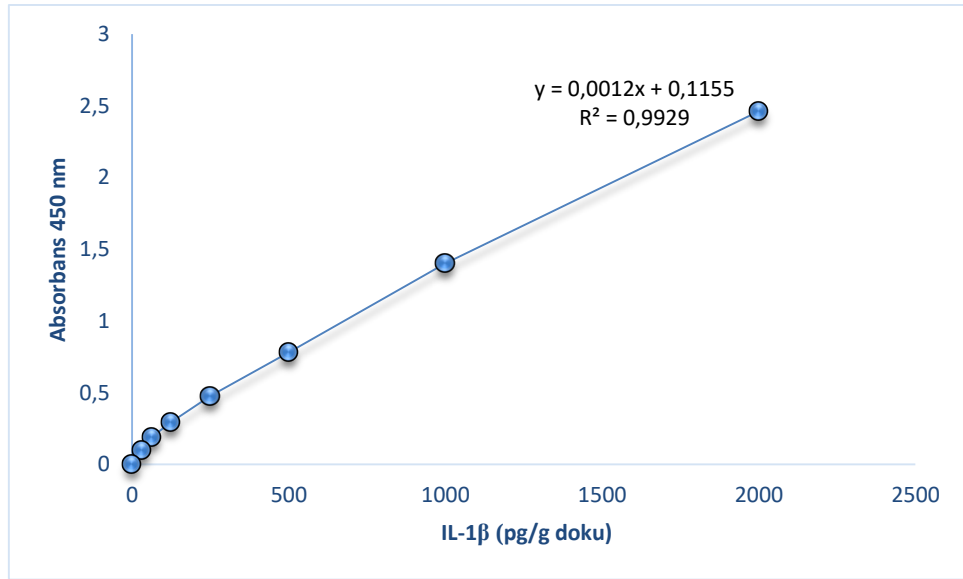
Doku Leptin seviyeleri enzime bağlı immünosorban yöntem (ELISA) Rat Leptin (Elabscience, Kat. No: E-EL-R0582) ticari kiti kullanılarak ölçüldü. Sonuçlar; 450 nm’de spektrofotometrik okuma yapılarak, oluşturulan standart grafik aracılığıyla ng/g doku olarak hesaplandı (Şekil 3.14).



Şekil 3.14. Leptin standart grafiği

Doku IL-1 β Seviyelerinin Tayini

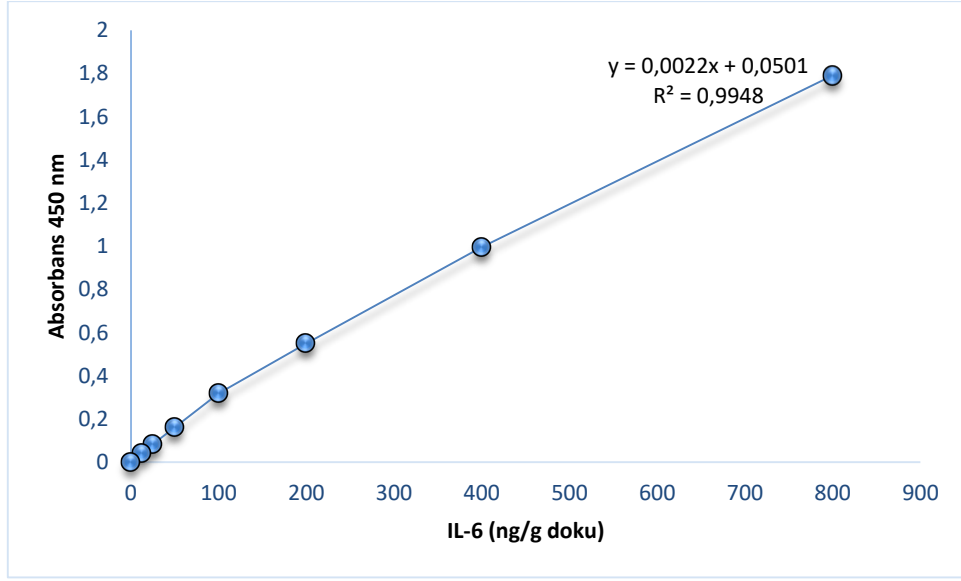
Doku IL-1 β seviyeleri enzime bağılı immünosorban yöntem (ELISA) Rat IL-1 β (Elabscience, Kat. No: E-EL-R0012) ticari kiti kullanılarak ölçüldü. Sonuçlar; 450 nm’de spektrofotometrik okuma yapılarak, oluşturulan standart grafik aracılığıyla pg/g doku olarak hesaplandı (Şekil 3.15).



Şekil 3.15. IL-1 β standart grafiği

Doku IL-6 Seviyelerinin Tayini

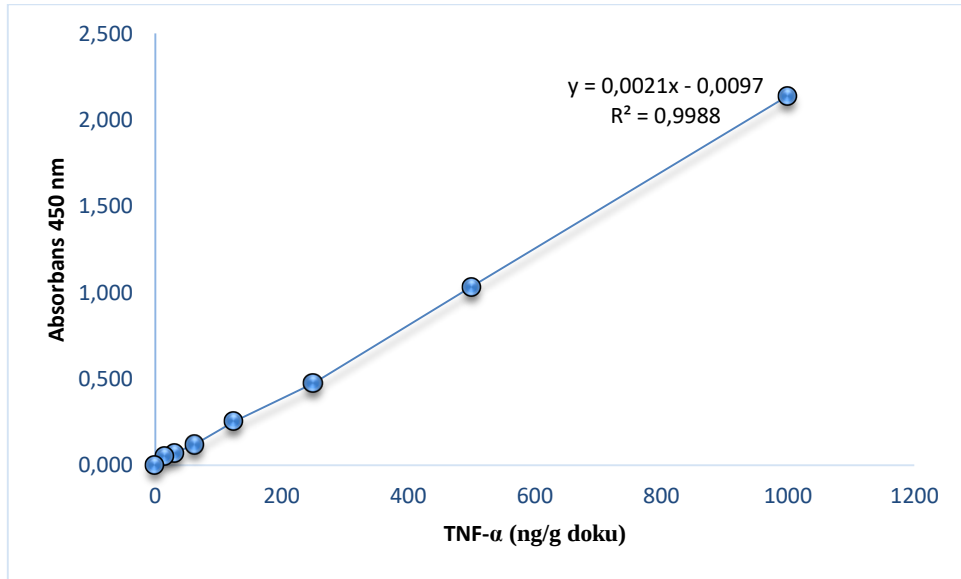
Doku IL-6 seviyeleri enzime bağılı immünosorban yöntem (ELISA) Rat IL-6 (Elabscience, Kat. No: E-EL-R0015) ticari kiti kullanılarak ölçüldü. Sonuçlar; 450 nm’de spektrofotometrik okuma yapılarak, oluşturulan standart grafik aracılığıyla ng/g doku olarak hesaplandı (Şekil 3.16).



Şekil 3.16. IL-6 standart grafiği

Doku TNF- α Seviyelerinin Tayini

Doku TNF- α seviyeleri enzime bağlı immünosorban yöntem (ELISA) Rat TNF- α (Elabscience, Kat. No: E-EL-R2856) ticari kiti kullanılarak ölçüldü. Sonuçlar; 450 nm’de spektrofotometrik okuma yapılarak, oluşturulan standart grafik aracılığıyla ng/g doku olarak hesaplandı (Şekil 3.17).



Şekil 3.17. TNF- α standart grafiği

3.6.4.4. Toplam Antioksidan Seviye (TAS) ve Toplam Oksidan Seviye (TOS)

Tayini

Toplam Antioksidan Seviye (TAS)

Karaciğer doku homojenatlarında TAS düzeyleri Rize Devlet Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı'nda bulunan AU680 Beckman Coulter otoanalizörü ile Rel Assay Toplam Antioksidan Status Test Kitleri (Mega Tıp San. ve Tic. Ltd. Şti., Türkiye) kullanılarak ölçüldü. Ölçüm sonucunda mmol Trolox ekivalent/L olan sonuçlar, mmol Trolox ekivalent/g doku olarak hesaplandı ve ardından OSI değerlerini hesaplayabilmek için µmol Trolox ekivalent/g doku şeklinde ifade edildi.

TAS Tayini Metodunun Prensibi

İndirgenmiş ABTS molekülü asidik ortamda (asetat tamponu, 30 mmol/L, pH:3.6) tek başına H_2O_2 kullanılarak $ABTS^{•+}$ molekülüne oksitlenir. Asetat tamponunda, konsantre (koyu yeşil) $ABTS^{•+}$ molekülleri daha uzun süre kararlı kalır. Yüksek pH değerinde daha konsantre bir asetat tampon solüsyonu (asetat tamponu, 0.4 mol/L, pH:5.8) ile dilüe edildiğinde, renk yavaşça kendiliğinden açılır. Numunede bulunan antioksidanlar konsantrasyonları ile orantılı olarak renkteki açılmayı bir dereceye kadar hızlandırırlar. Bu reaksiyon spektrofotometrik olarak izlenebilir ve renkteki açılma hızı örnekteki toplam antioksidan kapasite ile ters orantılıdır. Reaksiyon hızı, toplam antioksidan kapasite ölçüm yöntemleri için geleneksel standart olarak yaygın şekilde kullanılan Trolox ile kalibre edilir ve ölçüm sonuçları µmol Trolox ekivalent/g doku olarak ifade edilir.²⁵⁴

Toplam Oksidan Seviye (TOS)

Karaciğer doku homojenatlarında TOS düzeyleri Rize Devlet Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı'nda bulunan AU680 Beckman Coulter otoanalizörü ile Rel

Assay Toplam Oksidan Status Test Kitleri (Mega Tıp San. ve Tic. Ltd. Şti., Türkiye) kullanılarak ölçüldü. Ölçüm sonucunda $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ ekivalent/L sonuçlar, $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ ekivalent/g doku şeklinde hesaplandı.

TOS Tayini Metodunun Prensibi

Numunede bulunan oksidanlar, Fe^{+2} -o-dianisidine kompleksini Fe^{+3} iyonuna okside eder. Oksidasyon reaksiyonu, reaksiyon ortamında bol miktarda bulunan gliserol molekülleri ile arttırılır. Fe^{+3} iyonu asidik ortamda ksilenol oranj ile renkli bir kompleks oluşturur. Spektrofotometrik olarak ölçülebilen renk şiddeti, numunede bulunan toplam oksidan molekül miktarı ile ilgilidir. Ölçüm hidrojen peroksit ile kalibre edilir ve sonuçlar $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ ekivalent/g doku olarak ifade edilir.⁷⁵

Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)

Toplam oksidan seviyenin, toplam antioksidan seviyeye yüzde oranı oksidatif stres derecesinin belirteci olan OSİ değerini verir.

OSİ değerlerini hesaplamak için;

$$\text{OSİ} = [\text{TOS } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ ekivalent}) / \text{TAS } (\mu\text{mol Trolox ekivalent})] \times 100$$
 formülü kullanıldı.²⁵⁵

Serum Numunelerinde Biyokimyasal Parametrelerin Ölçülmesi

Serum numunelerinde AST, ALT, TK ve HDL düzeyleri AU680 Beckman Coulter otoanalizörü ile belirlendi.

3.7. Histopatolojik Analiz

Karaciğer

Sprague-Dawley cinsi dişi sıçanlardan ksilazin ve ketamin anestezisi altında altında çıkarılan karaciğer dokuları, serum fizyolojik damlatılarak hızlıca 1.5 cm^3

hacminde trimlendi. Elde edilen karaciğer dokusuna ait doku örnekleri fosfat tamponu ile tamponlanmış %10'luk nötral formalin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) solüsyonu ile 24-36 saat boyunca bekletilerek fiksasyon işlemi uygulandı. Bir sonraki aşamada rutin histolojik doku takip yöntemlerine uygun olarak dehidratasyon (%50, %70, %80, %90, %96 ve iki seri %100 atan etil alkol serisi (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) ve bu işlemi takiben sırası ile; şeffaflaştırma işlemi (iki seri ksilol solüsyonu, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), ardından yumuşak ve sert parafin (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) ile inklüzyon aşamaları doku takip cihazı (Thermo Scientific, Citadel 2000, UK) kullanılarak uygulandı. Parafin inklüzyonun işleminin ardından doku örnekleri doku gömme cihazı (Leica 1155 EG, Leica Biosystems, Germany) ve sert parafin kullanılarak doku gömme kasetlerine (Isolab GmbH, Germany) gömüldü. Elde edilen karaciğer dokusuna ait parafin bloklardan rotary mikrotom (Leica, RM2125RT, Germany) ile alınan 3-4 µm kalınlığındaki kesitler, hematoksilen (Harris hematoksilen, Merck, Germany)-Eosin (H&E) (Eosin G, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) ile boyanarak, ışık mikroskopunda (Olympus BX51, Olympus Corporation, Tokyo, Japan) Olympus DP74 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) kamera ile incelenerek fotoğraflandı.

3.8. İmmunohistokimyasal Analiz

Karaciğer

Çalışmamızda apoptotik hepatositlerin belirlenmesi için kullanılan Kaspaz-3 primer antikoru (Anti-Caspase-3 antibody [EPR18297], ab184787, Abcam, UK) ve bununla uyumlu sekonder antikorun inkubasyonları için tam otomatik IHC/ISH cihazı (BondMax, Leica Biosystems, Australia) kullanıldı ve immunreaktivitesinin belirlenmesi amacıyla avidin-biotin-peroksidaz kompleksi yöntemi uygulandı.

Primer ve sekonder antikor ile inkübe edilen karaciğer dokusuna ait parafin bloklardan 1-2µm kalınlığında elde edilen kesitler pozitif şarjlı (Patolab, China) lamlara alınarak deparafinizasyon işlemini uygulandı. Dokular üzerine diaminobenzidine chromogen (Ultraview, Leica Biosystems, Germany) solusyonu uygulanarak ışık mikroskopunda görüntü sinyali elde edildi. Harris Hematoksilen ile (Merck KGAA, Darmstadt, Germany) ile zıt olarak counterstaining boyaması tercih edildi.

Semi-Kantitatif Analiz

Karaciğer dokusuna ait histopatolojik hasar skorlaması periodontitis ve NAYKH çalışmalarına uygun olarak intralobüler ve perilobüler nekrozis, vasküler konjesyon ve periportal inflamasyon başlıkları altında Karaciğer Histopatolojik Hasar Skoru (LHDS)'na göre hesaplandı (Tablo 3.5).^{256,257}

Tablo 3.5. Karaciğer Histopatolojik Skoru (LHDS)

Özellik	Şiddet Düzeyi	Yüzdelik (%)	Skor
İntralobüler Nekroz	Yok	%≤5	0
	Hafif	%≤25	1
	Belirgin	%≤50	2
	Şiddetli	%≤75	3
İnterlobüler Nekroz	Yok	%≤5	0
	Hafif	%≤25	1
	Belirgin	%≤50	2
	Şiddetli	%≤75	3
Enflamasyon	Yok	%≤5	0
	Hafif	%≤25	1
	Belirgin	%50	2
	Şiddetli	%≤75	3
Adipozit Birikimi	Yok	%≤5	0
	Hafif	%≤25	1
	Belirgin	%≤50	2
	Şiddetli	%≤75	3

H+E ile boyanmış karaciğer dokusuna kesitler Tablo 3.5’te gösterildiği gibi her bir sıçana ait 30 farklı alanda çift kör histopatolog tarafından skorlandı (TM, LT). Kaspaz-3 primer antikoru ile inkübe edilen her bir sıçana ait karaciğer dokusuna ait kesitlerde pozitif hücre sayıları Tablo 3.6’da gösterildiği gibi çift kör histopatolog tarafından analiz edildi. Her bir sıçana ait preperatta 30 farklı alan rastgele olarak seçilerek IHC pozitivite skoru ölçüldü.

Tablo 3.6. Semi Kantitatif Analiz (İmmün Pozitiflik Skoru)

Özellik	Şiddet	Açıklama	Skor
Hepatositlerde İmmün Pozitiflik	Yok	$\% \leq 5$	0
	Hafif	$\% \leq 25$	1
	Belirgin	$\% \leq 50$	2
	Şiddetli	$\% \leq 75$	3

Çene

Çalışmamızda inflamasyonun belirlenmesi için proinflamatuvar sitokinlerden TGF- β primer antikorunun (TGF- β antibody [EPR18297], ab184787, Abcam, UK), odontoblastik ve osteoblastik aktivasyonu belirlemek, RANKL (RANKL antibody [EPR18297], ab184787, Abcam, UK) ve OPG primer antikorları (OPG p65 antibody [E379], ab325367, Abcam, UK) ve primer antikorlar ile uyumlu sekonder antikorla inkubasyonları tam otomatik IHC/ISH cihazı (BondMax, Leica Biosystems, Australia) kullanılarak, immunreaktivitesinin belirlenmesi amacıyla avidin-biotin-peroksidaz kompleksi dokular üzerine diaminobenzidine chromogen (Ultraview, Leica Biosystems, Germany) solusyonu kullanılarak ışık mikroskopunda görüntü sinyali elde edildi. Harris Hematoksilen ile (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) zıt olarak (counterstaining) boyanması tercih edildi.

Semi Kantitatif Analiz

Çene dokusuna ait histopatolojik hasar skorlaması sıçan periodontitis çalışmalarına uygun olarak, mine-sement kalınlığı CellSens programının (Olympus, Japonya) arbitrary probu kullanılarak ölçüldü.^{252,253} H+E ile boyanmış çene dokusuna ait kesitler sıçana ait 8 farklı preparatta x4 objektif büyüklüğünde farklı alanda çift kör histopatolog tarafından ölçüldü.

TGF- β , RANKL ve OPG primer antikoru ile inkübe edilen her bir sıçana ait çene dokusuna ait kesitlerde pozitif hücreleri sayıları Tablo 3.7’de gösterildiği gibi çift kör histopatolog tarafından analiz edildi. Her bir sıçana ait prerparatta 25 farklı alan rastgele olarak seçilerek IHC pozitivite skoru ölçüldü.

Tablo 3.7. İmmün-Pozitivite Skorlaması

Bulgu	Skor
İmmün-Pozitif Hücre Yoğunluğu	
Az	$\% \leq 5$ 0
Orta	$\% \leq 25$ 1
Yoğun	$\% \leq 50$ 2
Çok yoğun	$\% \leq 75$ 3

3.9. İstatistiksel Analiz

Histopatolojik ve immünohistokimyasal analizler sonucu elde edilen veriler SPSS 18.00 (IBM Corp., NY, USA) istatistik programı kullanılarak, Shapiro-Wilk test, Skewness-Kurtosis değerleri, Q-Q plot ve Levene s testleri ile değerlendirildi. Parametrik olmayan verilerde gruplar arasında analizler için Kruskal Wallis ve Tamhane T2 testi kullanıldı. Biyokimyasal verilerin değerlendirilmesinde ise Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ve Duncan testi kullanıldı. Çalışmadaki değişkenler için tanımlayıcı istatistikler ortalama, standart sapma, medyan, minimum, maksimum, sayı (n) ve yüzde (%) olarak ifade edildi. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Antropometrik Bulgular

Ratlarda HFHC diyet ile beslenme gelişimini analiz etmek için deneyin başlangıcından ve 18. haftanın sonuna kadar elde edilen antropometrik ölçümler Tablo 4.1'de verildi. 18. haftadaki vücut ağırlığı gruplar arasında anlamlı farklılık göstermektedir. NAYK + DP + Mel grubunun ağırlığı en yüksekken, Kontrol ve DP gruplarının ağırlıkları diğer gruplara göre anlamlı şekilde en düşüktü ($p=0.001$). NAYK + DP grubunun karaciğer ağırlığı diğer gruplara göre anlamlı şekilde yüksekken, Kontrol, DP ve NAYK + Mel gruplarının en düşüktü ($p=0.002$).

Tablo 4.1. Antropometrik Bulgular

	Kontrol	NAYK	DP	NAYK + DP	NAYK + Mel	NAYK + DP + Mel	p
Başlangıç Ağırlık	230,71±21,68	213,57±10,69	212,50±10,35	212,50±10,35	219,29±9,76	217,63±18,54	0,155
Ağırlık 18.hafta	230,71±21,68c	265,86±15,67b	220,00±20,70c	270,00±10,7b	262,57±12,9b	290,63±21,78a	0,001
Karaciğer ağırlık	5,90±0,60c	7,10±1,57b	6,30±0,94c	7,82±1,04a	6,43±0,74c	7,48±0,58b	0,002

ANOVA'ya göre anlamlılık düzeyleri; a,b,c: Gruplar arası farklılığı gösterir (Duncan post-hoc testi), Dp: deneysel periodontitis, NAYK: non alkolik yağlı karaciğer, Mel: melatonin, $p < 0.05$

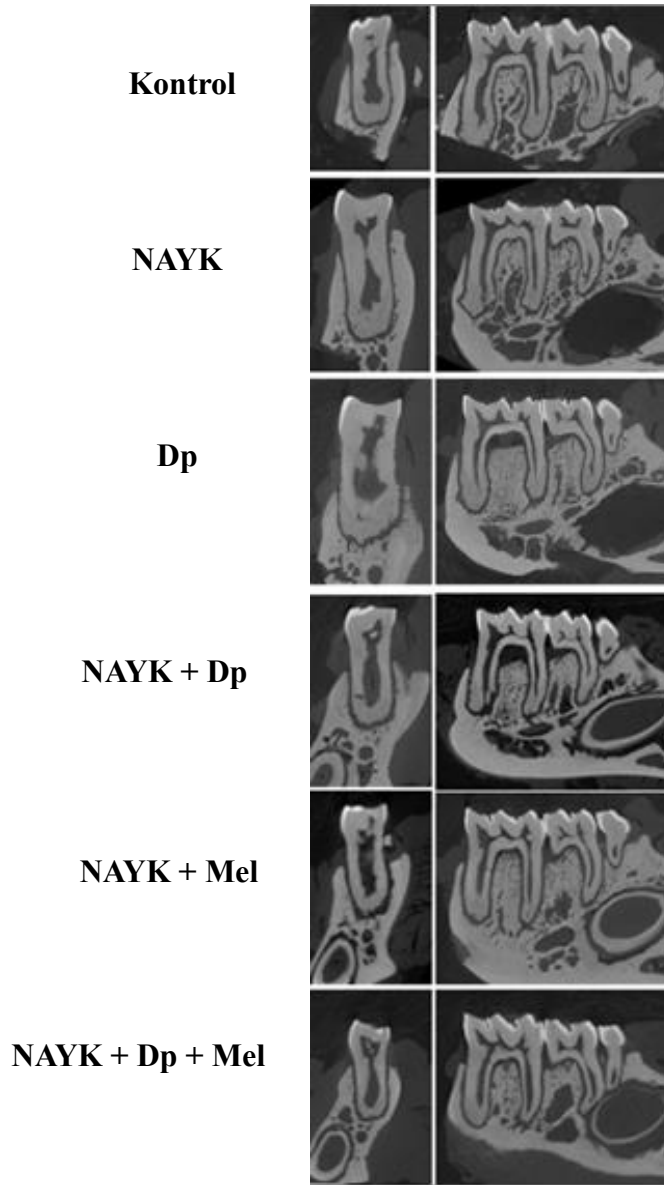
4.2. Morfometrik Bulgular (Alveoler Kemik)

Mikrobilgisayarlı tomografi kesitlerinde yapılan morfolojik ölçüm bulguları Tablo 4.2., Şekil 4.1.'de verildi. En yüksek MSB–AKK mesafe değeri NAYK (825.18 ± 398.51) grubunda görülürken, en düşük değer kontrol grubunda (291.79 ± 204.17) gözlemlendi.

Tablo 4.2. Alveolar kemik kayıplarının gruplararası karşılaştırılması

	Kontrol	NAYK	DP	NAYK + DP	NAYK + Mel	+ NAYK + DP + Mel	
	Ort ± SS	Ort ± SS	Ort ± SS	Ort ± SS	Ort ± SS	Ort ± SS	*p.
FÇ–AKK	0,00±0,00c	0,42±0,33b	0,69±0,15a	0,75±0,7a	0,13±0,08c	0,45±0,23b	0,001
Distal							
MSB–	0,64±0,20c	147,41±388,	476,76±668,	1239,5±180,	152,29±401,	927,68±591,	0,001
AKK		30c	58b	66a	15c	76a	
Bukkal							
MSB–	0,32±0,7c	0,52±0,19c	971,37±397,	1502,4±227,	0,40±0,14c	876,43±751,	0,001
AKK			12b	87a		40b	
Lingual							
MSB –	144,38±379,	153,86±404,	1091,0±456,	1452,6±235,	150,32±395,	1266,0±155,	0,001
AKK	94b	86b	34a	01a	84b	16a	

MSB: Mine–Sement Birleşimi, AKK: Alveolar Kemik Kreti, FÇ: Furkasyon çatısı, Dp: deneysel periodontitis, NAYK: non alkolik yağlı karaciğer, Mel: melatonin, SS: Standart Sapma, ANOVA’ya göre anlamlılık düzeyleri; a,b,c: Gruplar arası farklılığı gösterir (Duncan post-hoc testi)



**Şekil 4.1. Mandibular 1.molar dişlerin periodontal kemik kayıplarının
bukkolingual ve meziyodistal kesitlerde gösterimi**

NAYK: non alkolik yağlı karaciğer, Dp: deneysel periodontitis, Mel: melatonin

4.3. Histopatolojik Bulgular

Karaciğer

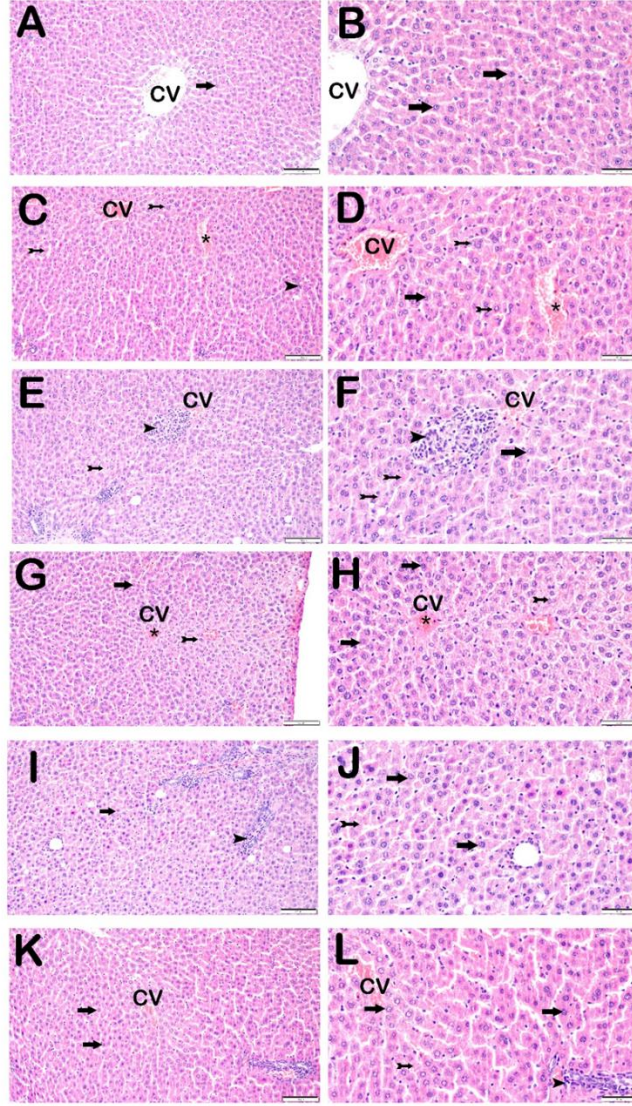
Periodontitis ve NAYKH modellenli hayvan deneyi çalışmamızda sıçanlardan çıkarılan karaciğer dokusuna ait kesitler ışık mikroskobu altında incelendiğinde kontrol grubuna ait kesitlerde Remark kordonlarının hem intralobular hemde interlobüler alanlarda normal yapıdaki hepatositler içerdiği izlendi (Tablo 4.3., Şekil 4.2.a-b, LHDS

0.5(0-1)). Bunun aksine, yalnızca Dp grubuna ait kesitlerde intralobular Remark kordonlarında yaygın nekrotik hepatositler bulunurken periportal alanlarda az sayıda nekrotik hepatositler mevcuttu. Ayrıca, periportal alanlarda inflamasyon ve karaciğer parankiminde vasküler konjesyonların bulunduğu izlendi (Tablo 4.3., Şekil 4.2.c-d, $P=0.001$ LHDS 5(4-6)). Benzer olarak, yalnızca NAYK grubunda kontrol grubuna kıyasla başta intralobular bölgeler olmak üzere nekrotik hepatositlerin azalmış olduğu saptandı (Tablo 4.3., $P=0.001$). Ancak yalnızca Dp grubuna kıyasla NAYK grubunda interlobüler alanlarda yaygın nekrotik hepatositlerin bulunduğu gözlemlendi (Tablo 4.3., $P=0.004$). Bunların yanında vasküler konjesyonlar ve perilobular alanlardaki infiltratif alanların kontrol grubuna kıyasla artmış olduğu gözlemlendi (Şekil 4.2.e-f, Tablo 4.3., $P=0.001$, LHDS 5(4-6)). NAYK + Dp grubunda ise kontrol grubuna kıyasla intralobüler ve interlobüler alanlarda yaygın nekrotik hepatositler mevcuttu. Periportal alanlarda yaygın inflamasyon ve karaciğer parankim dokusunda vasküler konjesyonlarda artış olduğu saptandı (Şekil 4.2.g-h, Tablo 4.3., $P=0.001$, LHDS 8(7-9)). Bunun aksine Dp+Mel grubunda yalnızca Dp grubuna kıyasla intralobüler ve interlobüler nekrozisin azalmış olduğu gözlemlendi (Tablo 4.3., Şekil 4.2.i-j, $P=0.001$, LHDS 3(2-4)). Benzer olarak, NAYK + Dp + Mel grubunda, Dp ve NAYK + Dp grubuna kıyasla başta intralobüler nekrozis olmak üzere interlobüler nekrozis, periportal inflamasyon ve vasküler konjesyonların azalmış olduğu gözlemlendi (Tablo 4.3., Şekil 4.2.k-l, $P=0.001$, LHDS 3(2-4)).

Tablo 4.3. Histopatolojik bulguların karşılaştırılması (HS, Medyan-%25-%75 interkuartil aralık)

Grup	İntralobüler Nekroz	İnterlobüler Nekroz	Enflamasyon	Vasküler Konjesyon	LHDS
Kontrol	0 (0–0)	0 (0–0)	0 (0–0)	0 (0–0)	0 (0–1)
DP	2 (1–2) ^a	1 (1–1) ^a	1 (1–2) ^a	2 (2–2) ^a	5 (5–6) ^a
NAYK	2 (1–2) ^{a, b}	2 (1–2) ^{a, h}	1 (0–2) ^{b, i}	1 (1–1) ^{a, d}	5 (4–6) ^{a, d}
DP+NAYK	2 (2–3) ^{a, b}	3 (3–3) ^{a, d, f}	1 (0–1) ^c	2 (1–2) ^{a, f}	8 (7–9) ^{a, b, f}
DP + Mel	1 (1–2) ^{a, c, e}	1 (1–2) ^{a, c, g}	0 (0–1)	0 (0–1) ^{d, f, g}	3 (2–4) ^{a, d, f, g}
DP+NAYK+Mel	1 (1–1) ^{a, d, f, g, h}	1 (1–1) ^{a, d, g}	1 (0–1)	0 (0–1) ^{d, f, g}	3 (2–4) ^{a, d, f, g}

^a P=0.001 Kontrol grubuna göre, ^b P=0.011 DP grubuna göre, ^c P=0.002 DP grubuna göre, ^dP=0.001 DP grubuna göre, ^e P=0.004 NAYK grubuna göre, ^f P=0.001 NAYK grubuna göre, ^g P=0.001 NAYK + DP grubuna göre, ^h P=0.004 DP grubuna göre, ⁱ P=0.031 Kontrol grubuna göre, Kruskal-Wallis / Tamhane T2 Testi, Dp: deneysel periodontitis, NAYK: non alkolik yağlı karaciğer, Mel: melatonin, LHDS: karaciğer histopatoloji skoru



Şekil 4.2. Harris Hematoksilen ve Eozin G ile boyanan karaciğer dokusuna ait kesitlerin temsili ışık mikroskopik resimleri.

A(x20)-B(x40) Kontrol Grubu: Karaciğer dokusu kesitlerinde Remark kordonlarında normal yapıdaki hepatositler (ok) izlenmekte (LHDS: Karaciğer Histopatoloji Skoru 0.5(0-1)). C(x20)-D(x40) DP Grubu: Karaciğer dokusunda Remark kordonlarında yaygın nekrotik hepatositler ile eşlik eden intralobüler nekrozis (ok ucu) ve az da olsa interlobular nekrotik hepatosit kordonları gözlenmekte. Bunun yanında, vasküler konjesyonlar (yıldız) ve perilobular alanlarda infiltratif alanlar (ok ucu) gözlenmekte (LHdS: 5(5-6)). E(x20)-F(x40) NAYK Grubu: Karaciğer dokusunda Remark kordonlarında hem intra lobüler nekrozis hem de perilobüler nekrozis olduğu izlenmekte. Bunun yanında, periportal infiltratif alanlar ve vasküler konjesyonların azalmış olduğu gözlenmekte (LHDS: 5(4-6)). G(x20)-H(x40), NAYK + DP Grubu: Karaciğer dokusunda yaygın olarak intra lobular ve perilobular nekrozisin yaygın olduğu gözlenmekte. Bunun yanında, periportal infiltratif alanlar ve vasküler konjesyonların izlenmekte (LHDS: 8(7-9)). I(x20)-J(x40) DP + Mel Grubu: Remark kordonlarında başta interlobüler alanlarda olmak üzere nekrotik hepatositlerin azalmış olduğu gözlenmekte. Periportal alanlarda inflamasyonun ve vasküler konjesyonların azalmış olduğu gözlenmekte (LHDS: 3(2-4)). K(x20)-L(x40) NAYK + DP +Mel Grubu: Karaciğer dokusunda Remark kordonlarında intra lobular nekrozis ve interlobüler nekrozisin azaldığı izlenmekte. Perilobular alanlarda periportal infiltratif alanlar ve vasküler konjesyonların azalmış olduğu izlenmekte (LHDS: 3(2-4)).

4.4. İmmunohistokimyasal Bulgular

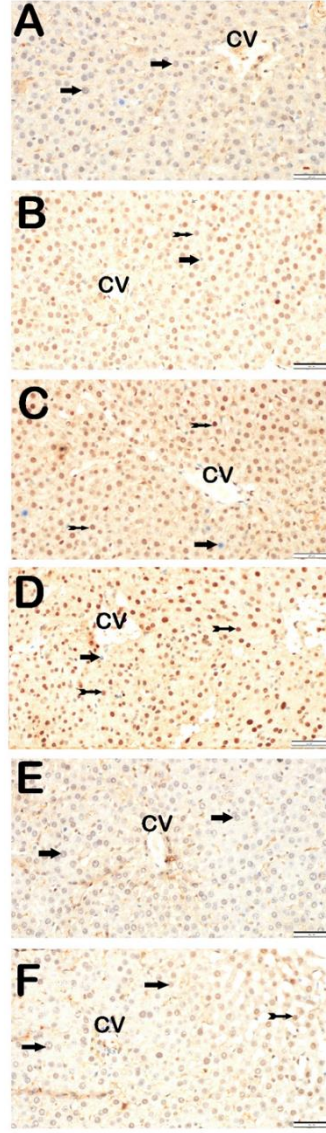
Karaciğer

Apoptotik hepatositleri belirlemek için biyobelirteç olarak Caspase-3 primer antikoru ile inkübe edilen karaciğer dokusuna ait kesitler ışık mikroskobu altında incelendiğinde; kontrol grubundaki Remark kordonlarında sağlıklı hepatositlerin Caspase-3 primer antikoru bakımından immün-negatif olduğu gözlemlendi (Tablo 4.4, Şekil 4.3.a, Caspase-3 pozitivite skoru: 0(0-1)). Bunun aksine, Dp grubunda kontrol grubuna kıyasla başta intralobüler alanlarda olmak üzere Remark kordonlarındaki yoğun Caspase-3 pozitivitesi gösteren apoptotik hepatositlerin kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak artmış olduğu saptandı (Tablo 4.4, Şekil 4.3.b, $P=0.035$, Caspase-3 pozitivite skoru: 1(0-2)). Benzer olarak NAYK grubunun karaciğer dokusuna ait kesitlerinde başta intralobüler alanlarda olmak üzere interlobüler Remark kordonlarında yoğun Caspase-3 pozitivitesi gösteren hepatositlerin kontrol grubuna kıyasla sayıca artmış olduğu gözlemlendi (Tablo 4.4, Şekil 4.3.c, $P=0.028$, Caspase-3 pozitivite skoru: 1(0-2)). Benzer olarak NAYK + Dp grubunun karaciğer dokusuna ait kesitlerinde intralobüler ve interlobüler alanlarda Remark kordonlarında kontrol grubuna kıyasla yoğun Caspase-3 pozitivitesi gösteren hepatositlerin sayıca artmış olduğu gözlemlendi (Tablo 4.4, Şekil 4.3.d, $P=0.001$, Caspase-3 pozitivite skoru: 2(2-3)). Bunun aksine, Dp+Mel grubu karaciğer dokusuna ait kesitlerde Caspase-3 pozitivitesi gösteren hepatositlerin, DP grubuna kıyasla anlamlı olarak azalmış olduğu gözlemlendi (Tablo 4.4, Şekil 4.3.e, $P=0.039$, Caspase-3 pozitivite skoru: 1(0-1)). Benzer olarak, NAYK + Dp + Mel grubunun karaciğer dokusuna ait kesitlerde inter ve intralobüler Remark kordonlarında Caspase-3 pozitivitesi gösteren hepatositlerin NAYK + Dp grubuna kıyasla anlamlı olarak azalmış olduğu gözlemlendi (Tablo 4.4, Şekil 4.3.f, $P=0.001$, Caspase-3 pozitivite skoru: 0(0-0.5)).

Tablo 4.4. Semi Kantitatif Analiz Sonuçları (Karaciğer) (Medyan-%25–%75 interkuartil aralık)

Grup	Caspase-3 Pozitiflik Skoru
Kontrol	0 (0–1)
DP	1 (0–2) ^a
NAYK	1 (0–2) ^b
DP + NAYK	2 (2–3) ^{c, d, f}
DP + Mel	0 (0–1) ^{h, i}
DP + NAYK + Mel	0 (0–0.5) ^{e, g, h}

^a P=0.035 Kontrol grubuna göre, ^b P=0.028 Kontrol grubuna göre, ^c P=0.001 Kontrol grubuna göre, ^d P=0.001 DP grubuna göre, ^e P=0.002 DP grubuna göre, ^f P=0.004 NAYK grubuna göre, ^g P=0.003 NAYK grubuna göre, ^h P=0.001 NAYK + DP grubuna göre, ⁱ P=0.039 NAYK + DP grubuna göre, Kruskal-Wallis / Tamhane T2 Testi, Dp: deneysel periodontitis, NAYK: non alkolik yağlı karaciğer, Mel: melatonin



Şekil 4.3. Caspase-3 primer antikoruna ile inkübe edilen karaciğer dokusuna ait kesitlerin temsili ışık mikroskobu görüntüleri

A(x40) Kontrol Grubu: karaciğer dokusu kesitlerinde Remark kordonlarında normal yapıdaki hepatositlerin (arrow) Caspase-3 primer anitkoruna bakımından immün-negatif olduğu gözlenmekte (Caspase-3 Positivity Score: 0(0-1)). B(x40) Dp Grubu: Karaciğer dokusunda Remark kordonlarında başta intralobular alanlarda hafif Caspase-3 immün-pozitivitesi gösteren hepatositler (tailed arrow) izlenmekte (Caspase-3 Positivity Score: 1(0-2)). C(x40) NAYK Grubu: Remark kordonlarında başta intralobular alanlarda olmak üzere Caspase-3 pozitivitesi gösteren hepatositler izlenmekte (Caspase-3 Positivity Score: 1(0-2)). D(x40) NAYK + Dp Grubu: Remark kordonlarında intralobular ve interlobular alanlarda yoğun Caspase-3 pozitivitesi gösteren apoptotik hepatositlerin (tailed arrow) yaygın olduğu izlenmekte (Caspase-3 Positivity

Score: 2(2-3)). E(x40) Dp + Mel Grubu: Karaciğer dokusu Remark kordonlarında intra lobular ve perilobular alanlarda yoğun Caspase-3 positivitesi gösteren apoptotik hepatositlerin azalmış olduğu izlenmekte (Caspase-3 Positivity Score: 1(0-1)). F(x40) NAYK + Dp + Mel Grubu: Remark kordonlarında başta intra lobular ve perilobular alanlarda Caspase-3 positivitesi gösteren apoptotik hepatositlerin azalmış (tailed arrow) olduğu ve yaygın olarak immün-negatif hepatositlerin (arrow) olduğu izlenmekte (Caspase-3 Positivity Score: 0(0-1)).

Alt Çene

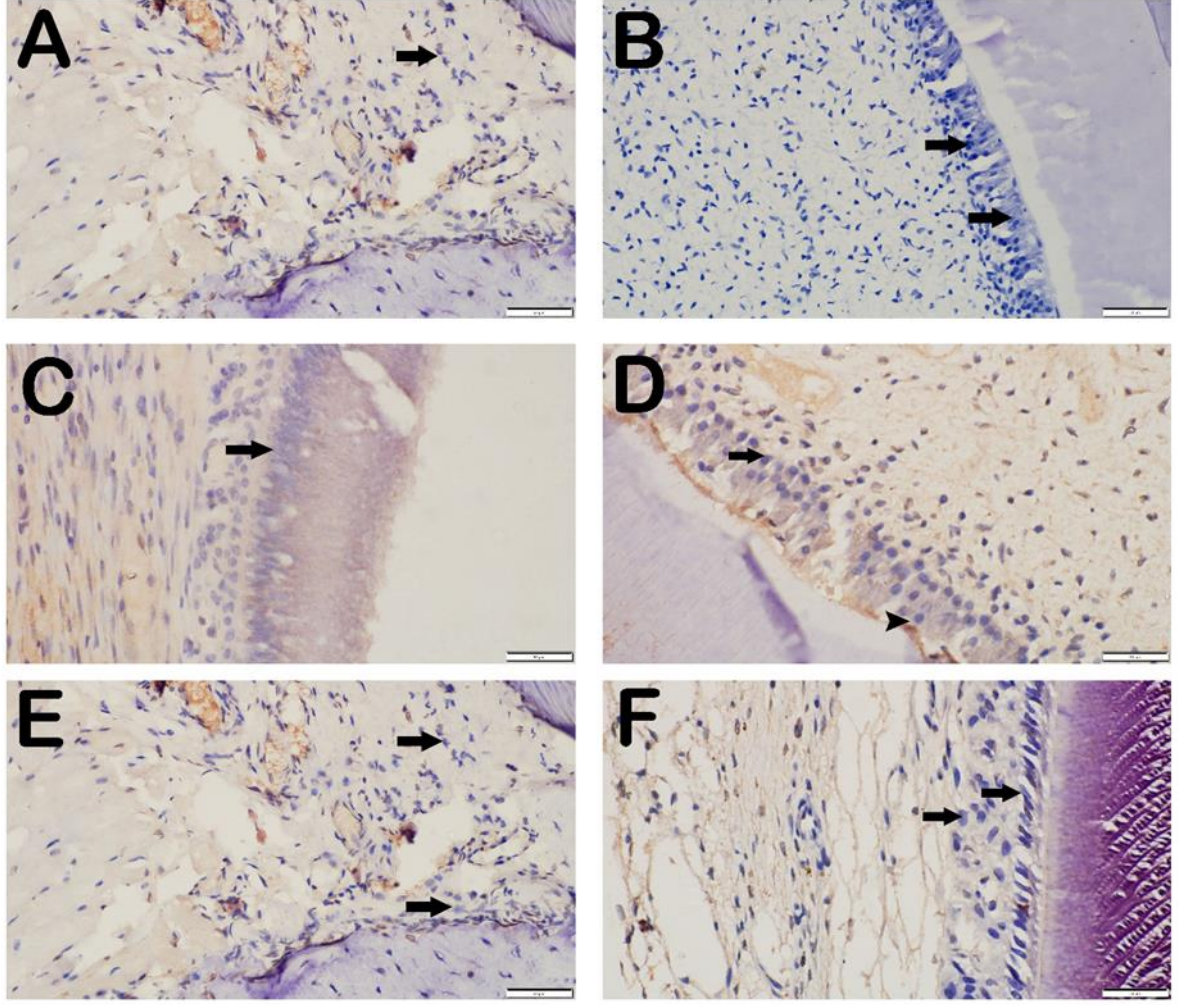
En yüksek TGF- β düzeyi, NAYK + DP grubunda görüldü (Tablo 4.5, Şekil 4.4). Diğer tüm gruplar kendi aralarında benzer ve anlamlı derecede daha düşük TGF- β düzeylerine sahipti (Tablo 4.5, Şekil 4.4). RANKL düzeyi de en yüksek olarak, NAYK+DP grubunda görülmektedir. Diğer tüm gruplar kendi aralarında benzer ve anlamlı derecede daha düşük RANKL düzeylerine sahipti (Şekil 4.5). OPG düzeyi en yüksek olarak, diğerlerinden açık ara farkla NAYK + DP grubunda görülmektedir. NAYK, DP, NAYK + Mel ve NAYK + DP + Mel grupları orta düzeyde OPG seviyelerine sahipti ve bu gruplar NAYK + DP grubundan anlamlı derecede düşük, Kontrol grubundan ise anlamlı derecede yüksek OPG seviyeleri gösterdi. En düşük OPG düzeyi Kontrol grubunda görüldü (Şekil 4.6).

Tablo 4.5. Semi-Kantitatif Analiz Sonuçları (Alveoler Kemik) (Medyan - %25-%75 interkuartil aralık)

Grup	TGF-β	RANKL	OPG
	Pozitivite	Pozitivite	Pozitivite
	Skoru	Skoru	Skoru
Kontrol	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0)
DP	0(0-0) ^a	0(0-0) ^a	1(1-2) ^a
NAYK	0(0-0) ^a	0(0-0) ^a	1(0-2) ^a
NAYK + DP	1(0-1) ^{a,b,c}	1(1-2) ^{e,f}	2(2-3) ^{a,f,e}
DP + Melatonin	0(0-1)	0(0-1) ^g	1(0-1) ^{g,h,i}
NAYK + DP + Melatonin	0(0-0)	0(0-1) ^g	0(0-1) ^{j,f}

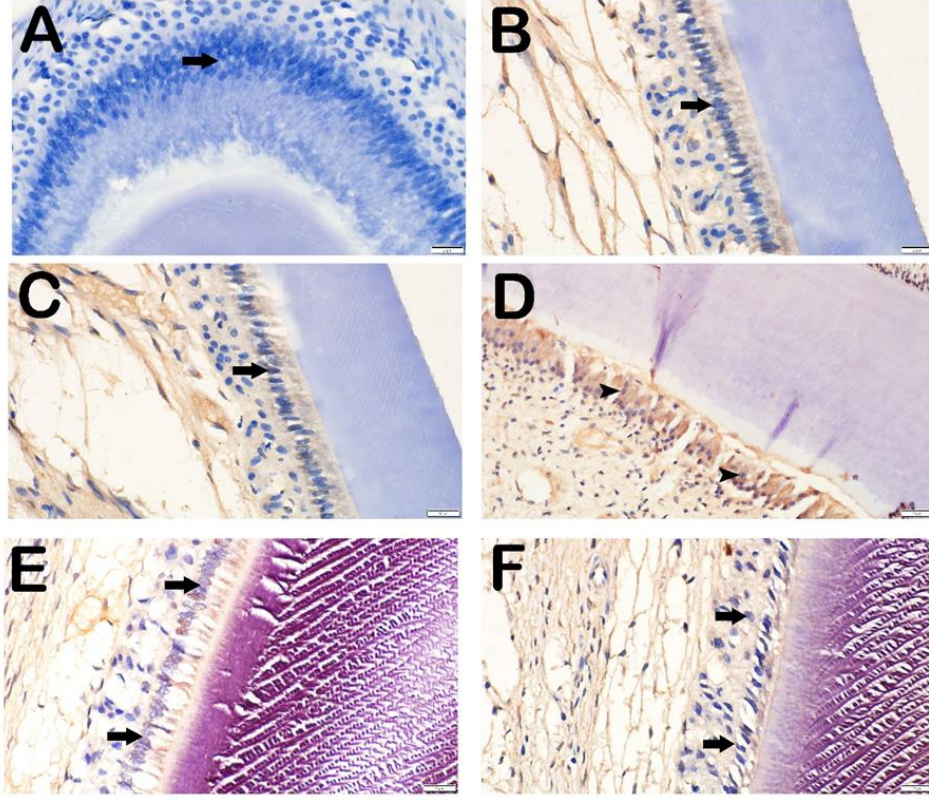
^a P = 0.009, Kontrol grubuna göre anlamlı fark, ^b P = 0.020, NAYK grubuna göre anlamlı fark, ^c P = 0.042, NAYK + DP grubuna göre anlamlı fark, ^d P = 0.001, Kontrol grubuna göre, ^e P = 0.001, NAYK grubuna göre, ^f P = 0.001, DP grubuna göre, ^g P = 0.001, NAYK + DP grubuna göre, ^h P = 0.009, Kontrol grubuna göre, ⁱ P = 0.007, DP grubuna göre, ^j P = 0.002, DP grubuna göre,

Kruskal-Wallis / Tamhane T2



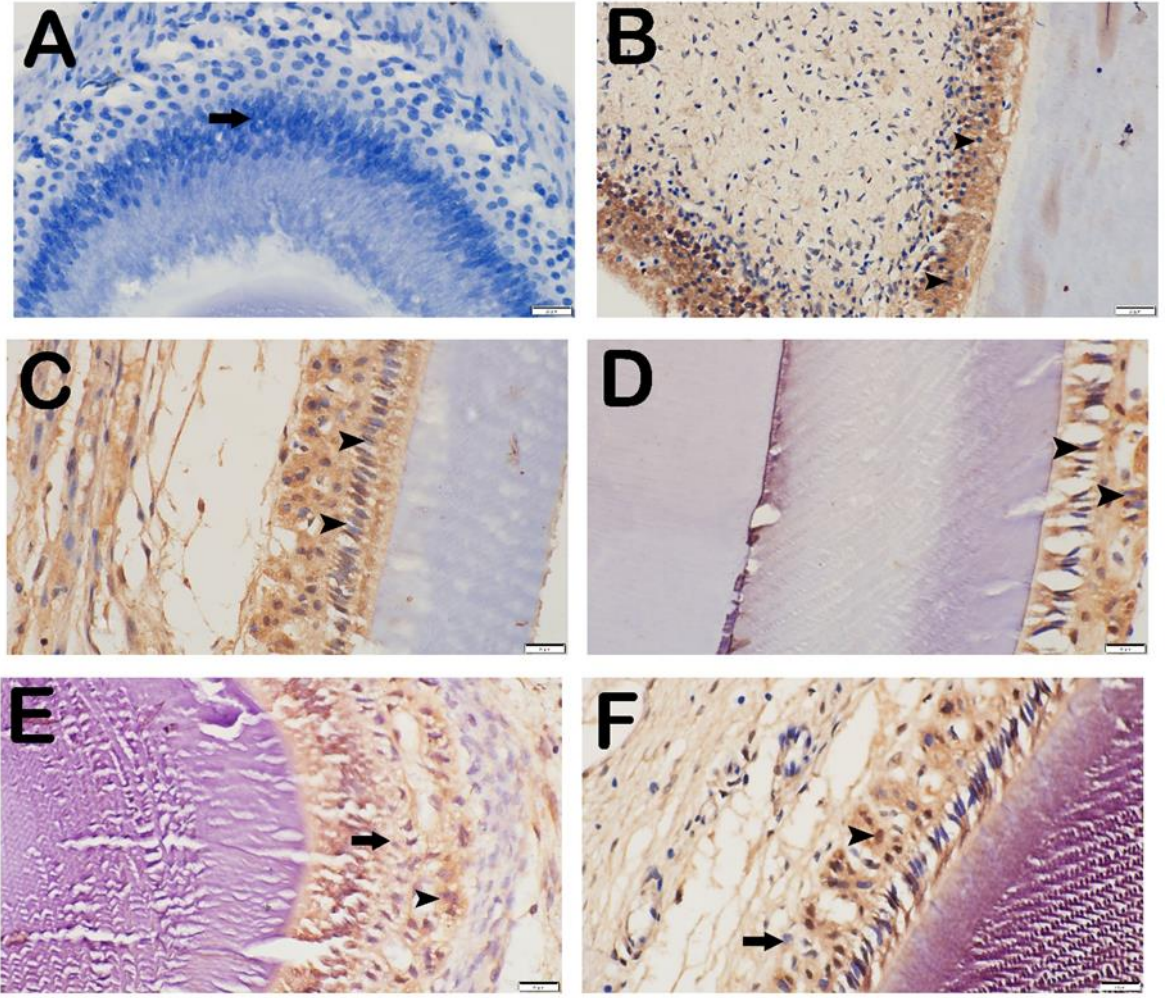
Şekil 4.4. Peridontitis modeli uygulanmış sıçanların TGF- β primer antikoruna ile inkübe edilen çene dokusuna ait kesitlerin temsili ışık mikroskopik görüntüleri

A(x40) Kontrol Grubu: Çene dokularına ait kesitlerde TGF- β primer antikoruna bakımından immün-negatif olan normal yapıdaki hücreler (ok) gözlenmekte (TGF- β Pozitivite skoru: 0(0-0)). **B(x40) DP Grubu:** Çene dokusunda başta TGF- β immün-negatif hücreler (ok) izlenmekte (TGF- β pozitivite skoru: 0(0-0)). **C(x40) NAYK Grubu:** Çene dokusunda TGF- β primer antikoruna bakımından immün-negatif hücreler izlenmekte (ok, TGF- β pozitivite skoru: 0(0-0)). **D(x40) NAYK + DP Grubu:** Çene dokusunda yer yer hafif TGF- β pozitivitesi gösteren hücreler (ok başı) bulunmakla izlenmekte (TGF- β pozitivite skoru: 1(0-1)). **D(x40) DP + Melatonin Grubu:** Çene dokusunda TGF- β pozitivitesi gösteren hücrelerin azalmış olduğu gözlenmekte (TGF- β pozitivite skoru: 0(0-1)). **E(x40) NAYK + DP + Melatonin Grubu:** Çene dokularındaki hücrelerde TGF- β pozitivitesi gösteren hücrelerin azalmış olduğu gözlemlenmekte (TGF- β pozitivite skoru: 0(0-0)).



Şekil 4.5. Peridontitis modeli uygulanmış sıçanların RANKL primer antikoruna ile inkübe edilen çene dokusuna ait kesitlerin temsili ışık mikroskobu görüntüleri

A(x40) Kontrol Grubu: Çene dokularına ait kesitlerde RANKL immün-negatif olan normal yapıdaki hücreler (ok) gözlenmekte (RANKL Pozitivite skoru: 0(0-0)). **B(x40) DP Grubu:** Çene dokusunda başta RANKL primer antikoruna bakımından immün-negatif hücreler (ok) izlenmekte (RANKL pozitivite skoru: 0(0-0)). **C(x40) NAYK Grubu:** Çene dokusunda RANKL primer antikoruna bakımından immün-negatif hücreler izlenmekte (RANKL pozitivite skoru: 0(0-0)). **D(x40) NAYK + DP Grubu:** Çene dokusunda yer yer hafif RANKL pozitivitesi gösteren hücreler (ok başı) bulunmakla izlenmekte (RANKL pozitivite skoru: 1(1-2)). **E(x40) DP + Melatonin Grubu:** Çene dokusunda RANKL pozitivitesi gösteren hücrelerin azalmış olduğu gözlenmekte (RANKL pozitivite skoru: 0(0-1)). **F(x40) NAYK + DP + Melatonin Grubu:** Çene dokularındaki hücrelerde RANKL pozitivitesi gösteren hücrelerin azalmış olduğu gözlenmekte (RANKL pozitivite skoru: 0(0-1)).



Şekil 4.6. Peridontitis modeli uygulanmış sıçanların OPG primer antikoru ile inkübe edilen çene dokusuna ait kesitlerin temsili ışık mikroskobu görüntüleri

A(x40) Kontrol Grubu: Çene dokularına ait kesitlerde immün-negatif olan normal yapıdaki hücreler (ok) gözlenmekte (OPG Pozitivite skoru: 0(0-0)). **B(x40) DP Grubu:** Çene dokusunda OPG immün-pozitivitesi gösteren hücreler (ok başı) izlenmekte (OPG pozitivite skoru: 1(1-2)). **C(x40) NAYK Grubu:** Çene dokusunda OPG primer antikoru bakımından immün-pozitif hücreler izlenmekte (ok başı, OPG pozitivite skoru: 1(0-2)). **D(x40) NAYK + DP Grubu:** Çene dokusunda yoğun OPG pozitivitesi gösteren hücreler (ok başı) gözlenmekte (OPG Pozitivite Skoru: 2(2-3)). **D(x40) DP + Melatonin Grubu:** Çene dokusunda OPG pozitivitesi gösteren hücrelerin azalmış olduğu gözlenmekte (OPG pozitivite skoru: 1(0-1)). **E(x40) NAYK + DP + Melatonin Grubu:** Çene dokularındaki hücrelerde yoğun OPG pozitivitesi gösteren hücrelerin azalmış olduğu izlenmekte (OPG pozitivite skoru: 0(0-1)).

4.5. Biyokimyasal Bulgular

Çalışmanın biyokimyasal bulguları Tablo 4.6’da verildi.

Tablo 4.6. Biyokimyasal bulguların gruplararası karşılaştırılması

	Kontrol (Ort±SS)	NAYK (Ort±SS)	Dp (Ort±SS)	NAYK+Dp (Ort±SS)	NAYK+Mel (Ort±SS)	NAYK+Dp+Mel (Ort±SS)	p
Adiponektin	1474,07±66,82	1383,83±103,00	1424,31±68,18	1412,24±48,61	1437,78±50,57	1445,81±54,98	,214
Leptin	170,25±3,67	178,75±11,03	178,00±10,52	173,75±5,04	170,86±4,53	168,50±14,63	,194
IL-1β	8,67±a0,52	7,75±0,55c	8,03b±0,71	8,13±0,32b	8,42±0,33a	8,64±0,83a	,027
IL-6	14,58±b0,51	15,93±1,25a	15,28±0,91a	15,72±0,87a	15,03±0,54a	14,56±0,82b	,014
TNF-α	17,13±0,29b	17,97±0,96a	17,89±0,91a	17,93±0,32a	16,74±0,58b	16,61±0,78b	,001
GSH	23,93±1,62	22,21±2,66	26,28±2,08	21,77±2,01	22,25±4,02	24,21±4,69	,054
MDA	124,17±32,16	138,01±22,85	164,14±32,50	150,53±22,90	136,05±11,45	135,31±24,47	,065
TAS	13289,28±1598,74	13304,09±2413,90	14484,26±2075,16	14153,07±1828,88	13736,44±1035,83	13011,33±1185,94	,543
TOS	147,18±19,84c	134,26±13,26c	155,35±7,16b	154,98±32,62b	174,80±39,16a	182,86±37,78a	,021
OSİ	1,11±0,12c	1,05±0,31c	1,09±0,16c	1,10±0,21c	1,28±0,30b	1,46±0,39a	,036
AST	168,47±23,96c	289,56±110,19a	165,30±28,31c	216,53±158,59b	127,99±19,07c	162,43±32,32c	,012
ALT	42,19±6,60b	73,31±18,02a	51,84±9,20b	43,48±11,85b	46,53±10,51b	48,46±6,58b	,001
Total Kolesterol	69,62±3,55	72,65±12,26	81,05±13,86	70,41±11,37	76,28±12,80	71,28±15,52	,446
HDL	58,54±2,52	56,80±6,43	67,10±12,15	51,93±10,82	64,84±12,81	56,43±13,77	,075

* Tek yönlü ANOVA’ya göre anlamlılık düzeyleri; a,b,c: Gruplar arası farklılığı gösterir (Duncan post-hoc testi) Dp: deneysel periodontitis, NAYK: non alkolik yağlı karaciğer, Mel: melatonin , TNF : Tumor Nekrozis Faktör , IL : İnterlökin , GSH : Glutatyon , MDA : Malondialdehit , TAS : Toplam Antioksidan Seviye , TOS : Toplam Oksidan Seviye , OSİ : Oksidatif Stres İndeksi , HDL : Yüksek Yoğunluklu Lipid

4.5.1. Doku Pro-inflamatuar ve Anti-inflamatuar Sitokin Bulguları

4.5.1.1. Doku IL-1β, IL-6 ve IL-10 Bulguları

Dokularda incelenen IL-1β seviyeleri, NAYK ve NAYK+Mel gruplarında diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşüktü ($p<0.05$). Diğer gruplardaki IL-1β seviyeleri arasında ise anlamlı fark yoktu ($p>0.05$). IL-6 düzeyleri incelendiğinde, Kontrol ve NAYK + DP + Mel gruplarındaki değerler, diğer gruplara göre anlamlı şekilde düşüktü ($p<0.05$) ve diğer gruplararası istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p>0.05$). TNF-α düzeyleri incelendiğinde NAYK, Dp, NAYK+Dp gruplarının TNF-α düzeyleri, Kontrol, NAYK+Mel ve NAYK+Dp+Mel gruplarına göre anlamlı şekilde yüksekti ($p<0.05$).

4.5.2. Doku Oksidan-Antioksidan Parametrelerin Bulguları

4.5.2.1. Doku Malondialdehit ve Glutatyon Bulguları

Doku GSH değerlerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p>0.05$). En düşük GSH seviyesi NAYK+Dp grubunda, en yüksek GSH seviyesi ise Dp grubunda gözlemlendi. Melatonin uygulanan gruplarda GSH seviyesi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da arttı. Doku MDA seviyelerine bakıldığında gruplar arasında anlamlı fark yoktu ($p>0.05$). MDA seviyeleri NAYK, Dp ve NAYK+Dp gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı olmasa da yüksekti. En düşük MDA seviyesi kontrol grubunda, en yüksek MDA seviyesi ise Dp grubunda gözlemlendi. Melatonin uygulanan gruplarda, MDA seviyesi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da azaldı.

4.5.2.2. Doku TAS, TOS ve OSİ Bulguları

Doku TAS seviyeleri incelendiğinde gruplar arasında anlamlı fark gözlenmedi ($p>0.05$). En düşük TAS değeri NAYK+Dp+Mel grubunda, en yüksek değer ise Dp grubunda bulundu. NAYK+Dp ve NAYK+Dp+Mel gruplarındaki TOS değerleri diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksekti ($p<0.05$). Dp ve NAYK+Dp gruplarının TOS seviyesi ise kontrol ve NAYK gruplarına göre anlamlı şekilde yüksekti ($p<0.05$). OSİ değerlerine bakıldığında, kontrol, NAYK, Dp, NAYK+Dp grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p>0.05$). NAYK+Mel ve NAYK+Dp+Mel gruplarının OSİ değeri diğer gruplara göre anlamlı şekilde yüksekti ($p<0.05$). NAYK+Dp+Mel grubunun OSİ değeri tüm gruplara göre anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p<0.05$).

4.5.2.3. Doku Adiponektin ve Leptin Bulguları

Doku adiponektin değerine bakıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi ($p>0.05$). En düşük adiponektin değeri NAYK grubunda, en

yüksek değer ise kontrol grubunda bulundu. NAYK + Dp + Mel grubunda NAYK + Dp grubundan daha yüksek adiponektin değerleri bulundu.

Doku leptin düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p = 0.214$). En düşük leptin değeri NAYK + Dp + Mel grubunda, en yüksek değer ise NAYK grubunda bulundu. NAYK ve Dp grubunda kontrol grubundan daha yüksek leptin değerleri bulundu. NAYK grubunda NAYK + Mel grubundan daha yüksek leptin değerleri bulundu.

4.5.2.4. Serum AST, ALT, Total kolesterol ve HDL Bulguları

Karaciğer hasar belirteci AST düzeyleri anlamlı farklılık göstermektedir. NAYK ve NAYK + DP gruplarının AST düzeyleri, diğer gruplardan anlamlı derecede daha yüksektir. En düşük AST düzeyi NAYK + Mel grubunda görülmektedir. Diğer karaciğer hasar belirteci ALT düzeyleri de anlamlı farklılık göstermektedir. NAYK grubunun ALT düzeyi, diğer tüm gruplardan anlamlı derecede daha yüksektir. Total kolesterol değerlerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$). En yüksek değer Dp grubunda, en düşük değer kontrol grubunda bulundu. NAYK grupları kontrol grubundan daha yüksek total kolesterol değerleri bulundu. HDL değerlerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$). En yüksek değer Dp grubunda, en düşük değer NAYK + Dp grubunda bulundu. NAYK + Dp + Mel grubunda NAYK + Dp grubundan daha yüksek HDL değerleri bulundu.

5. TARTIŞMA

Hayvan çalışmaları, bilginin klinik ortama aktarılabilmesi, sebep-sonuç ilişkilerinin kurulması ve verilerin daha doğru yorumlanabilmesi açısından kritik bir öneme sahiptir.²⁵⁸ Bazı çalışmalar in vitro sistemlerle gerçekleştirilebilse de, elde edilen verilerin insanlara transfer edilmeden önce güvenliğinin ve etkinliğinin test edilmesi için hayvan modellerine ihtiyaç vardır. Fare veya rat gibi küçük hayvan modelleri, inflamasyon sırasında yumuşak ve sert doku arasındaki etkileşimlerle ilgili önemli veriler sağlayabilmektedir. Bununla birlikte, sistemik inflamasyonun potansiyel mekanizmaları ve bunun periodontal iyileşme süreci üzerindeki etkisi, in vivo olarak incelenebilmektedir.²⁵⁹

Ratlar, periodontal hastalıkların patogenezi üzerine yapılan çalışmalarda en yaygın kullanılan hayvanlardır. Deneysel çalışmalarda, molar diş bölgelerinin periodontal yapısının insana benzerlik göstermesi, maliyetlerinin uygun olması, temin edilebilirliğinin, beslenmelerinin ve üretilmelerinin kolay olması gibi avantajlar nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedir. Ayrıca, oluşturulan deneysel periodontal hastalığın histopatolojik ve klinik bulgularının insanlara oldukça benzer olduğu bildirilmiştir. En yaygın kullanılan rat türleri ise Wistar Albino ve Sprague-Dawley'dir.²⁶⁰⁻²⁶²

Ratlarda inflamasyonu indükleyerek deneysel periodontal hastalık oluşturmak için iki yaygın yöntem bulunmaktadır. Birinci yöntem, bakteriler ve/veya bakteriyel virülans faktörlerinin (örneğin; LPS) bölgeye enjekte edilerek akut bir periodontal patoloji oluşturulmasıdır. Bu yöntem, hızlı bir şekilde hastalık gelişimi sağlama avantajına sahip olmakla birlikte, bakterilerin endotoksinine karşı verilen akut inflamatuvar yanıt oluşturması ve enfeksiyonun bakteriler tarafından oluşturulmaması gibi dezavantajlara da sahiptir.²⁵⁸ İkinci yöntem ise mikroorganizmaların kolonizasyonuna

izin veren ligatürlerin dişlerin etrafına yerleştirilmesidir. Bu şekilde, dentogingival bölgede mekanik travmaya, dental plağa karşı gelişen konak yanıtının yoğunlaşmasına ve doku bütünlüğünün bozulmasına olanak sağlanır.²⁶³ Plak birikimi, sulkuler epitelin ülserasyonuna yol açarak ve bağ dokusuna invazyonu kolaylaştırarak, insanlardaki gibi periodontal doku harabiyetini başlatmaktadır. Bu deneysel hayvan modeli, doğal plak oluşumuna en yakın model olarak kabul edilmektedir.²⁵⁸ Bu nedenle, çalışmamızda, Sprague Dawley cinsi dişi ratların azı dişlerinin etrafına 4.0 ipek sütür ligatürleyip, 35 gün yerinde kalması sağlanarak periodontitis ile ilişkili inflamasyon ve kemik yıkımı oluşturmaya çalışıldı.

Mevcut çalışmada amacımız, periodontitisin NAYKH'na sahip ratlarda inflamasyon üzerine etkisini ve sistemik melatonin uygulamasının inflamasyonu ve karaciğerdeki patolojik değişiklikleri sınırlayıcı etkinliğini araştırmaktır. Bilgimize göre, çalışmamız, melatoninin periodontitisle ilişkili NAYKH'nda karaciğer hasarı üzerindeki terapötik aktivitesini biyokimyasal, histopatolojik ve immünohistokimyasal açılardan kapsamlı bir şekilde değerlendiren ilk çalışmadır. Çalışmamızın sonuçlarına göre, yüksek yağlı ve yüksek kolesterolü diyetle beslenen sıçanlarda, ligatür kaynaklı periodontitisin, inflamasyon ve oksidatif stresle ilişkili biyokimyasal değişikliklere neden olduğu, apoptozisi indüklediği ve karaciğer fonksiyonlarında bozulma meydana getirdiği gösterildi.

İnflame periodontal dokuda bulunan zararlı faktörlerin karaciğere taşınması henüz tam olarak bilinmese de karaciğerin anatomik ve fizyolojik özelliklerine dayanarak iki olası mekanizma önerilmektedir: 1) Periodontal ceplerde meydana gelen mikröülserasyonlar aracılığıyla periodontal patojenler, bunlara ait virülans faktörleri, endotoksinler ve inflamatuvar medyatörler (ROT'lar, IL-1 β , IL-6, TNF- α) sistemik dolaşıma katılabilir.²⁶⁴⁻²⁶⁷ Karaciğere ulaşımın, abdominal aorttan dallanan hepatik arter

yoluyla gerçekleştiği varsayılmaktadır. 2) Alternatif bir yolak ise, oral bakterilerin gastrointestinal sistem üzerinden taşınarak bağırsak mikrobiyotasında disbiyozise neden olmasıdır. Bu oral mikrobiyota kaynaklı disbiyozis, bağırsak bariyer bütünlüğünü ve immün modülasyonu bozarak, karaciğerin portal ven sistemi aracılığıyla bakteriler, endotoksinler ve bakteriyel metabolitlere maruz kalmasına neden olabilir.^{268,269}

Sunulan hayvan çalışmasında, mikro BT’de alınan bukkolingual ve mezyodistal kesitlerde mine semet sınırı (MSS)-alveoler kemik (AK) arası ve furkasyon çatısı (F)-furkal alveoler kemik kreti (FAK) arasındaki mesafe ölçüldü. Yapılan radyomorfometrik sonuçlar incelendiğinde Dp ve NAYK + Dp gruplarında MSS-AK ve F-FAK mesafeleri diğer gruplara göre anlamlı şekilde yüksekti. Melatonin uygulaması sonrası ise bu değerlerde anlamlı azalma gözlendi. Literatürde bu sonuçlarla uyumlu çalışmalar mevcuttur.^{8,270} Bulgularımızı destekleyecek şekilde, Bayrakdar ve ark.²⁷⁰ yüksek yağlı diyet ile beslenen periodontitisli ratların radyolojik değerlendirmesinde daha yüksek ataşman kaybı olduğunu bildirmişlerdir. Bulgularımız, literatürle uyumlu şekilde NAYKH’nın periodontal hastalığın yaygınlığını ve şiddetini artırabileceği bilgisini desteklemektedir.^{271,11}

Bu hayvan modelinde karaciğer dokusundaki oksidatif durumu değerlendirmek amacıyla MDA, GSH, TOS, TAS ve OSİ parametreleri incelenmiştir. MDA, hücre membranındaki oksidatif hasarın önemli bir biyokimyasal göstergesidir ve oksidatif stres düzeyini belirlemede en yaygın kullanılan belirteçlerden biridir. MDA, membran fosfolipitlerine yönelik oksidatif hasar hakkında dolaylı bilgi sağlar. Oluşumunun ardından hızla diffüze olan MDA, membran yapısındaki lipid ve proteinler ile çapraz bağlar oluşturarak membran bütünlüğünü bozar ve bu süreç, membran permeabilitesinin artmasına neden olur. Farklı NAYKH modeli alışmalarında^{13,272} MDA düzeyinin yükseldiği gösterilmiştir. GSH ise temel hücresel antioksidan olarak kabul edilmektedir

ve hücrel oksidatif hasarın inhibisyonunda önemli bir rol oynar.⁸⁹ Oksidatif stres düzeyinin belirlenmesinde MDA gibi spesifik oksidatif yıkım ürünleri önemli bilgiler sağlamakla birlikte, bu parametreler dokudaki toplam oksidatif dengeyi veya nihai oksidatif durumu tam olarak yansıtmakta yetersiz kalabilmektedir.

Benzer şekilde, yalnızca belirli enzimatik veya non-enzimatik antioksidan seviyelerinin ölçülmesi, dokunun genel antioksidan kapasitesini tam anlamıyla yansıtmada yetersiz kalabilmektedir. Güncel literatür, TOS ve TAS parametrelerinin, dokudaki nihai oksidatif ve antioksidan durumun daha kapsamlı ve güvenilir bir şekilde değerlendirilmesine olanak sağladığını bildirmektedir. Ayrıca, pratik ve güvenilir bir yöntem olan TAS'ın bilinen antioksidanların yanı sıra henüz tanımlanmamış antioksidan bileşiklerin etkilerini de yansıtabildiği vurgulanmaktadır. OSİ ise TOS ile TAS arasındaki oransal ilişkiyi ifade eden, oksidatif dengeyi değerlendirmede oldukça geçerli ve bütüncül bir parametre olarak kabul edilmektedir. Oksidatif stres düzeyini daha net ve pratik bir şekilde ortaya koymak amacıyla Erel tarafından önerilmiştir.⁷⁵ Hem ROT üretimi hem de antioksidan durumdan doğrudan etkilenmektedir.⁷⁵

Bulgularımız, HFHC diyet ve periodontitis arasındaki ilişkinin, daha ciddi karaciğer hasarına yol açan işbirlikçi bir etkiye sahip olabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, bu süreçte rol oynayan mekanizmalar henüz araştırılmamıştır. Lipid peroksidasyon göstergesi olan MDA düzeylerinin, DP ve NAYK+DP gruplarında NAYK ve kontrol grubuna kıyasla anlamlı olmasa da yüksek olması, periodontitisin oksidatif stres mekanizmalarını tetikleyerek karaciğerde lipid peroksidasyonunu artırdığını düşündürmektedir. Bu bulgu, literatürde periodontitisin sistemik inflamasyonu artırarak uzak organlarda oksidatif hasara yol açtığını gösteren önceki çalışmaları desteklemektedir.^{273, 274}

Mevcut çalışmada periodontitisli ratlarda karaciğer OSI değerlerinin anlamlı şekilde yükseldiği, MDA, GSH ve TAS değerlerinde ise anlamlı değişiklik olmadığını gösterildi. Andrade ve ark.¹³ yüksek yağlı diyet + Dp grubunda Dp ve kontrol grubuna göre MDA düzeylerinde anlamlı yükselme, GSH değerlerinde ise anlamlı azalma tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda antioksidan parametreler olan GSH ve TAS değerlerinin periodontitisli ratlarda kontrol grubuna göre anlamlı olmayan düzeyde yükseldiği bulundu. GSH düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmaması, endojen antioksidan savunma mekanizmalarının belirli düzeylerde korunduğunu veya adaptif yanıtlar nedeniyle sabit kaldığını işaret edebilir. Ancak bu durum, lipid peroksidasyonunun artmasına rağmen antioksidan kapasitenin yetersiz kaldığını da gösterebilir. Melatonin uygulanan gruplarda MDA seviyelerinin DP ve NAYK+DP gruplarına göre daha düşük olduğunu gösteren bulgularımız, melatoninin güçlü bir antioksidan olarak oksidatif hasarı azalttığını düşündürebilir. Bu, melatoninin antioksidan ve inflamasyon modülatör etkilerini vurgulayan önceki raporlarla uyumludur.^{275, 276}

Mevcut çalışmada, IL-1 β , IL-6, TNF- α , leptin, adiponektin düzeyleri biyokimyasal olarak değerlendirildi. Yağ dokusu tarafından üretilen TNF- α , IL-1 β , IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinler ve leptin, adiponektin gibi adipokinler, alkolsüz yağlı karaciğer hastalığında hepatik lipid birikimi, inflamasyon, fibroz ve karsinogenez ile yakından ilgilidir.¹⁵³ Obez kişilerin artmış yağ dokusunda, kemotaktik protein-1'in artan salgılanması, öncelikle makrofajlar olmak üzere inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonuna neden olur ve bunlar daha sonra adipositlerin adipokin üretim dengesini bozan inflamatuvar sitokinler ve kemokinler salgılar.¹⁵⁴ Adipokinler sadece lokal yağ dokusundaki kronik inflamasyonu ve insülin direncini değil, aynı zamanda hepatik insülin duyarlılığını da doğrudan etkiler. Adipositler gibi, periodontal dokudaki hücreler de çeşitli adipokinler salgılayabilir.^{157, 159} Periodontitisli hastalarda leptin gibi

proinflatuar adipositokinlerin serum seviyeleri yükselir ve antiinflatuar adipokin adiponektinin serum seviyeleri düşer.²⁷⁷

Hayvan çalışmamızın biyokimyasal incelemesinde, özellikle NAYK, Dp, NAYK + Dp grupları, kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede daha yüksek IL-1 β seviyeleri sergilemektedir. Bulgularımızda hem NAYK hem de DP gruplarında IL-1 β düzeylerinin yüksek bulunması, bu iki hastalığın bağımsız olarak sistemik inflamasyonu artırdığını göstermektedir. Özellikle NAYK + DP grubunda IL-1 β artışının devam etmesi, iki patolojinin birlikte bulunduğu durumlarda inflamatuvar yanıtın daha da şiddetlendiğini düşündürmektedir. Literatürde, periodontitisin yüksek yağlı diyet ile beslenen ratlarda sistemik inflamasyonun ve proinflatuar sitokin seviyelerinin arttığı bildirilmiştir.²⁷⁸

²⁷⁰ Bulgularımızda NAYK+Mel grubunda NAYK grubuna göre IL-1 β düzeyinde anlamlı fark olmasa da, NAYK+Dp+Mel grubunda istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalma gözlemlendi. Literatüre bakıldığında melatonin uygulaması sonrası IL-1 β düzeyinde anlamlı şekilde azalma bulan çalışmalar vardır.^{279,280} Bu durumun melatoninin antiinflatuar etkisi nedeniyle olduğunu düşünmekteyiz.

Çalışmamızda IL-6 düzeyleri incelendiğinde, kontrol ve NAYK + DP + Melatonin gruplarında ölçülen IL-6 düzeylerinin diğer tüm gruplara kıyasla anlamlı şekilde daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, hem melatoninin antiinflatuar etkilerini hem de melatoninin periodontitisin NAYKH ile ilişkili sistemik inflamasyon üzerindeki modölatör rolünü desteklemektedir. Çalışmamızda, NAYK + DP grubunda IL-6 seviyelerinin yükselmiş olması, periodontal inflamasyonun, var olan karaciğer hastalığını sistemik olarak daha da ağırlaştırabileceğini düşündürmektedir. Bu bulgu, periodontitisin sistemik inflamasyonu artırarak NAYKH'nın ilerlemesine katkıda bulunduğunu gösteren önceki çalışmalarla paralellik göstermektedir.^{10, 281}

Buna karşın, NAYK + DP + Melatonin grubunda IL-6 düzeylerinin kontrol grubuyla benzer ve NAYK+Dp grubuna göre düşük bulunması, melatoninin hem lokal hem de sistemik inflamasyon üzerindeki baskılayıcı etkilerini ortaya koymaktadır. Melatoninin antiinflamatuvar etkileri, nükleer faktör kappa B (NF-κB) gibi inflamasyonla ilişkili sinyal yollarının inhibisyonu yoluyla açıklanabilir. ^{275, 282} Ayrıca, melatoninin hepatik hücrelerde inflamatuvar sitokin üretimini baskıladığı ve oksidatif stresi azalttığı bildirilmiştir. ^{283, 241}

Bu çalışmada TNF-α düzeyleri incelendiğinde, NAYK, DP ve NAYK + DP gruplarında ölçülen değerlerin, Kontrol, NAYK + Mel ve NAYK + DP + Mel gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular, hem NAYKH hem de periodontitisin sistemik inflamasyon düzeyini artırdığını, melatonin tedavisinin ise bu inflamatuvar yanıtı baskılayabildiğini göstermektedir. Çalışmamızda, hem NAYK hem de DP gruplarında TNF-α düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yüksek bulunması, bu iki hastalığın inflamatuvar doğasına işaret etmektedir. Özellikle NAYK + DP grubunda TNF-α seviyelerinin daha da artması, iki patolojinin birlikte bulunduğu durumlarda inflamasyonun sinerjik şekilde şiddetlendiğini göstermektedir. Bu sonuç, periodontitisin sistemik inflamatuvar yükü artırarak NAYKH progresyonunu kötüleştirebileceğini destekleyen literatürle örtüşmektedir. ^{10, 281}

Öte yandan, melatonin uygulanan gruplarda, özellikle NAYK + DP + Mel grubunda TNF-α düzeylerinin anlamlı olarak azaldığı gözlemlenmiştir. Bu durum, melatoninin antiinflamatuvar etkileriyle açıklanabilir. Melatonin, proinflamatuvar sitokinlerin üretimini baskılayarak inflamasyonla ilişkili sinyal yollarını (örneğin NF-κB) inhibe eder ve oksidatif stresin azalmasına katkı sağlar. ^{275, 284} Çalışmamızda bu mekanizmaların etkili olduğu düşünülmektedir.

Bulgularımızda leptin ve adiponektin düzeyleri incelendiğinde, gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmadı. Damanaki ve ark.²⁸⁵ yüksek yağlı diyetle beslenen ratlarda adipoz dokuda leptin ve adiponektin düzeylerinin yükseldiğini bulmuşlardır. Bizim deneyimizde anlamlı farklılık bulunmaması, deney süremizin kısa olması, ratların vücut yağ kütlesi ve beslenme şeklindeki farklılıklardan kaynaklanmış olabilir.

Verilerimiz, değerlendirilen parametrelerdeki değişikliklerin periodontitis ve HFHC diyet ile beslenme arasındaki ilişkiden kaynaklandığını göstermektedir. Yüksek kalorili toplam alımın steatoz ile ilişkili olduğu bilinmektedir ve çeşitli çalışmalar, doymuş yağlar ve karbonhidratlar gibi belirli besin öğelerinin hastalığın gelişimi ve geçişindeki rolünü göstermiştir.^{286, 287}

Çalışmamızda gözlemlendiği gibi, periodontitisin yağ ve kolesterol açısından zengin beslenmeyle ilişkisi, karaciğer inflamasyon derecesinde, MDA, karaciğerde steatoz skoru, ratların ağırlığı, rat serumunda ALT, AST gibi diğer parametrelerde önemli bir artışa neden olmuştur.

Karaciğer, lipit homeostazında önemlidir.^{288,289} Periodontitisin neden olduğu karaciğer değişiklikleriyle birlikte, lipit metabolizması toplam kolesterol seviyelerinde artışa yol açan değişikliklere uğrar. Çalışmamızda, periodontitisli ve yüksek yağlı diyet uygulayan gruptaki toplam kolesterol konsantrasyonları, kontrol grubuna kıyasla anlamlı olmamakla beraber daha yüksekti. Ayrıca, HDL kolesterol düzeyleri NAYK gruplarında kontrole göre anlamlı olmamakla beraber daha düşük bulundu. Bulgularımız literatürle uyumludur.^{290,291} HDL, heterojen yoğunluklu bir lipoproteindir ve bu vakada mevcut olan dislipidemi göz önüne alındığında, HDL seviyeleri düşmüştür. Çalışmamızda, periodontitisle ilişkili yüksek yağlı diyet, periodontitis grubuyla karşılaştırıldığında HDL seviyelerini kötüleştirmiştir.

ALT ve AST, steatoz tanısında sıklıkla ihtiyaç duyulan karaciğer lezyonu belirteçleridir.^{182,292} Karaciğer hastalığı olan hastaların kanında bu belirteçlerin seviyeleri yüksektir. Bu çalışmada, NAYK grubunda ALT ve AST seviyelerinin de arttığı gösterilmiştir; bu da HFHC bir diyetin varlığında karaciğer hastalığının arttığı anlamına gelir. Çalışmamızda, melatonin uygulaması sonrası ise AST ve ALT değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlemlendi.

Periodontitis ve NAYK modeli bulunan hayvan çalışmamızın histopatolojik incelemesinde, kontrol grubuna kıyasla Dp, NAYK, Dp + NAYK gruplarında intralobüler ve interlobüler alanlarda yaygın nekrotik hepatositler mevcuttu. Periportal alanlarda yaygın inflamasyon ve karaciğer parankim dokusunda vasküler konjesyonlarda artış vardı. Andrade ve ark.¹³, Carvalho ve ark.¹⁸¹, Vasconcelos ve ark.²⁷³ kontrol grubuna kıyasla periodontitis gruplarının karaciğer dokusunda bulgularımızla benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Bu gruplar içerisinde bulgularımız değerlendirildiğinde, karaciğerde bulunan hücresel dejenerasyon ve inflamasyon, proinflamatuvar sitokinler ve oksidatif stres tarafından çeşitli yollarla provoke edilen inflamatuvar aktivitedeki artışın sonucu olabilir. Çalışmamızda ayrıca, sistemik melatonin uygulamasının Dp + Mel grubunda yalnızca Dp grubuna kıyasla ve Dp + NAYK + Mel grubunda Dp, Dp + NAYK gruplarına göre karaciğer dokusunda bulunan histopatolojik hasarı anlamlı olarak azalttığı saptanmıştır. Melatonin uygulanan grupların intralobüler ve interlobüler nekroz skorlarının azaldığı, inflamasyonun ve yağlanmanın gerilediği bulunmuştur. Bu da melatoninin karaciğer mikromimarisinde koruyucu etkinliğini desteklemektedir. Ayrıca NAYK histopatolojisinde vasküler konjesyon ve sinüzoidal yapının bozulması, erken fibrojeniz olarak bilinmekle beraber, melatonin uygulanan gruplarda bu bozulmanın gerilemesi fibrozisin önlenmesinde de etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Periodontal hastalığın en önemli göstergelerinden biri alveolar kemik kaybıdır ve bu kaybın oluşum mekanizmasının anlaşılması, hastalığın tedavi sürecine ışık tutması açısından büyük önem taşır. Periodontitisle ilişkili alveolar kemik kaybı mekanizmasının açıklanmasında özellikle TNF reseptör ailesine ait üç üye öne çıkmaktadır: RANKL, RANK ve OPG.^{52,78} Bu çalışmada, hayvan modelinde alveolar kemik yıkımını değerlendirmek amacıyla RANKL ve OPG belirteçleri kullanılmıştır. TGF- β ise , kronik inflamasyon ve fibrozis süreçlerinde önemli rol oynar.²⁹³ Hem bağ dokusu tamirini destekleyebilir hem de bağışıklık yanıtını tetikleyebilir. Periodontitis gibi kronik inflamatuvar durumlarda TGF- β düzeyleri yükselebilir. Çalışmamızda bu belirteçlerin analizinde immünohistokimyasal yöntemlerden yararlanılmıştır. Histolojik incelemeler kemiğin yapısal özelliklerini ve inflamasyonu incelemek için RANKL, OPG ve TGF- β ekspresyonunu araştırmada sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir.

Çalışmamızda RANKL düzeyi NAYK + DP grubunda diğer gruplara göre anlamlı şekilde yüksekti. Diğer tüm gruplar kendi aralarında benzer ve anlamlı derecede daha düşük RANKL düzeylerine sahipti. NAYK + DP grubunda RANKL düzeyinin en yüksek olması, osteoklast aktivitesinde artışı ve kemik yıkımına yatkınlığı gösterir. Literatürde yer alan çeşitli çalışmalarda, bulgularımızla paralel olarak, periodontitisli ratlarda RANKL düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı şekilde yüksek olduğu rapor edilmiştir.^{294,295} Taubman ve ark. ²⁹⁶ yaptıkları hayvan deneyinde RANKL aktivitesinin baskılanmasının periodontal hastalıkta osteoklastogenezis sürecini iyileştirebileceğini ortaya koymuştur.

Bulgularımızda OPG düzeyinin NAYK + DP grubunda diğer gruplara göre anlamlı olarak yükseldiği görülmektedir. NAYK, DP, NAYK + Mel ve NAYK + DP + Mel grupları NAYK + DP grubundan anlamlı derecede düşük, kontrol grubundan ise anlamlı derecede yüksek OPG seviyeleri göstermiştir. Literatüre bakıldığında ise

bulgularımızdan farklı olarak, periodontitisli ratlarda kontrol grubundakilere göre OPG seviyelerinde anlamlı azalma bulunmuştur. Melatonin uygulaması sonrası ise hem RANKL hem de OPG seviyelerinde azalma gözlemlendi.

Bulgularımızda en yüksek TGF- β düzeyi, NAYK + DP grubunda gözlemlendi. NAYK+DP grubundaki TGF- β düzeyi, kontrol, DP ve NAYK gruplarına göre anlamlı farklılık gösterirken, DP ve NAYK gruplarındaki TGF- β düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı farklılık gösterdi. Bulgularımızla uyumlu olarak, periodontitis modellerinde, yükselen inflamasyon seviyeleriyle birlikte TGF- β ekspresyonunun artış gösterdiği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir.^{297,298} Bu artış, hem onarıma yönelik yanıt hem de doku stresine tepki olabilir. Melatonin uygulaması sonrası ise TGF- β düzeylerinde azalma gözlemlendi.

Mevcut deneysel çalışmamızda ayrıca, periodontitisin olası apoptotik etkileri kaspaz-3'ün immünohistokimyasal boyama yöntemi ile değerlendirilmesiyle elde edilmiştir. Kaspaz-3 aktivasyonu, hücre ölüm sürecinde geri döndürülemez bir son aşama olarak kabul edilmekte ve bu nedenle apoptozisin özgül bir biyobelirteci olarak kullanılmaktadır. Hayvan modeli verilerimiz, periodontitis ile birlikte var olan NAYK grubunda kaspaz-3 ekspresyonunun anlamlı şekilde arttığını göstermektedir. Bildiğimiz kadarıyla, çalışmamızdan başka karaciğer üzerinde periodontal enflamasyonun apoptozis etkilerini değerlendiren bir hayvan çalışması bulunmaktadır.²⁹⁹ Bu çalışmada Cao ve ark.²⁹⁹ karaciğer dokusunda kaspaz-3'ün ekspresyon seviyelerini western blot ile analiz etmiş ve kaspaz-3 seviyelerinin periodontitis grubunda kontrole kıyasla anlamlı olarak daha yüksek bulmuşlardır. Ayrıca çalışmamızda sistemik melatonin uygulamasının kaspaz-3 ekspresyonunu belirgin şekilde azalttığı bulunmuştur. Melatonin, bilindiği üzere güçlü bir antioksidan ve antiinflamatuvar ajan olup, mitokondriyal zar stabilitesini koruyarak sitokrom c salınımını engelleyebilir, böylece kaspaz-9 ve sonrasında kaspaz-3

aktivasyonunu baskılayabilir.^{300,301} Bulgularımızda melatonin uygulanan gruptaki kaspaz-3 pozitif hücre sayısındaki düşüş, melatoninin hepatoprotektif ve antiapoptotik etkilerini desteklemektedir. Benzer şekilde, önceki deneysel çalışmalarda da melatoninin karaciğerde apoptozu inhibe ettiği ve doku hasarını azalttığı rapor edilmiştir.^{302,303}

Çalışmamız bazı limitasyonlara sahiptir. Deneysel periodontitis modelinde destek doku yıkımı insanlardakinin aksine akut olarak ortaya çıkmakta ve yıkıcı bir şekilde ilerlemektedir. Şiddetli lokal inflamatuvar cevaba bağlı olarak belirgin sistemik, inflamatuvar etkiler ortaya çıkmaktadır. Bu sebeple bulgularımızın insanlardaki periodontitis ile direkt olarak ilişkilendirilmesi hatalı olabilir. İkinci olarak, deneye sadece dişi ratların dahil edilmesi bulguların her iki cinsiyet açısından yorumlanmasını mümkün kılmamaktadır. Son olarak, ne yazık ki ratlarda periodontitis tedavisinde etkinliği genel olarak kabul edilmiş bir melatonin uygulama protokolü (doz, uygulama şekli, uygulama zamanı, uygulama süresi vb.) henüz mevcut değildir. Bu nedenle bu konuda insan çalışmalarına öncülük edebilecek yeni ve daha kapsamlı deneysel çalışmalara ihtiyaç olduğu açıktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu deneysel çalışmada; HFHC diyeti ile beslenen ratlarda NAYK ve DP modellerinin radyomorfometrik, histopatolojik ve immunohistokimyasal verileri incelenmiştir. Bu deneysel çalışma, Ratlarda 35 gün süreyle 4.0 ipek ligatür uygulanmasının, plak birikimi ve mekanik retansiyon yoluyla inflamasyona ve belirgin bir alveolar kemik kaybına neden olduğunu, tek başına NAYKH varlığında alveoler kemik kaybında artış olduğunu, NAYKH ve periodontitisin birlikte uygulanmasının da belirgin bir alveoler kemik kaybına neden olduğunu, NAYKH oluşturulmasını ve ligatürle indüklenen periodontitis fazını takiben uygulanan 14 günlük (10 mg/kg/gün) sistemik melatonin uygulamasının, NAYKH ilişkili periodontitiste meydana gelen alveolar kemik kaybını belirgin olarak sınırlandırabildiğini, Deneysel periodontitisin rat karaciğer dokusunda apoptotik değişikliklerin yanı sıra histopatolojik olarak dejenerasyonlara neden olduğunu, periodontitis indüksiyon fazını takiben uygulanan 14 günlük (10 mg/kg/gün) sistemik melatonin tedavisinin söz konusu inflamatuvar ve yapısal bozulmaları belirgin olarak sınırlandırabildiğini, Deneysel periodontitis ve NAYKH tek başlarına uygulandığında karaciğer dokusunda kaspaz-3 pozitifliğinde anlamlı artış olduğunu, NAYKH ve periodontitisin birlikte uygulanmasının daha belirgin bir artış sağladığını, periodontitis indüksiyon fazını takiben uygulanan 14 günlük (10 mg/kg/gün) sistemik melatonin tedavisinin kaspaz-3 pozitifliğinde belirgin bir şekilde azalmaya neden olduğunu, Deneysel periodontitis ve NAYKH tek başlarına uygulandığında alt çene dokusunda TGF- β , RANKL ve OPG pozitifliğinde anlamlı artış olduğunu, NAYKH ve periodontitisin birlikte uygulanmasının bu parametrelerde daha belirgin bir artış sağladığını, periodontitis indüksiyon fazını takiben uygulanan 14 günlük (10 mg/kg/gün) sistemik melatonin tedavisinin TGF- β , RANKL ve OPG pozitifliğinde belirgin bir şekilde azalmaya neden olduğunu, Deneysel periodontitisin karaciğer fonksiyonlarını gösteren

parametrelerde (AST, ALT, total kolesterol, HDL) hafif bir artışa neden olduğunu ve periodontitis indüksiyon fazını takiben uygulanan 14 günlük (10 mg/kg/gün) sistemik melatonin tedavisinin bu parametrelerde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığını , Deneysel periodontitisin ve NAYKH'nın tek başlarına ve birlikte uygulanmalarının rat periodontal dokularında OSİ, MDA ve GSH seviyelerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığını, periodontitis indüksiyon fazını takiben uygulanan 14 günlük (10 mg/kg/gün) sistemik melatonin tedavisinin MDA'da anlamlı olmasa da hafif bir azalmaya, GSH'ta anlamlı olmayan hafif bir artışa, OSİ değerinde ise anlamlı artışa neden olduğunu, Deneysel periodontitisin ve NAYKH'nın tek başlarına ve birlikte uygulanmalarının rat periodontal dokularında IL-1 β , IL-6 ve TNF- α seviyelerinde anlamlı artışa neden olduğunu ve periodontitis indüksiyon fazını takiben uygulanan 14 günlük (10 mg/kg/gün) sistemik melatonin tedavisinin bu parametrelerde anlamlı azalmaya neden olduğunu, Deneysel periodontitisin ve NAYKH'nın tek başlarına ve birlikte uygulanmalarının rat periodontal dokularında adiponektin düzeyinde anlamlı olmasa da hafif bir azalmaya, leptin düzeyinde ise anlamlı olmasa da hafif bir artışa neden olduğunu ve periodontitis indüksiyon fazını takiben uygulanan 14 günlük (10 mg/kg/gün) sistemik melatonin tedavisinin adiponektin düzeyinde anlamlı olmasa da hafif bir artışa, leptin düzeyinde ise anlamlı olmasa da hafif bir azalmaya neden olduğunu ortaya koydu.

Çalışmanın sonuçları, melatoninin hem karaciğerde hem de periodontal dokularda koruyucu etkileri olduğunu göstermektedir. Karaciğer dokusunda periodontitis tarafından provoke edilen ve uzun dönemde fonksiyonel bozulmalara da neden olabilecek oksidatif stres, proinflamatuvar-anti inflamatuvar sitokin dengesinin bozulması, enzimatik aktivite ve belirgin yapısal patolojilerin azaltılmasında, sistemik melatonin uygulaması önemli bir konak modülatör ajan olabilir. Gelecekte insan modellerinde kontrollü klinik çalışmalarla bu etkinin doğrulanması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

1. Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000*. 1997;14:9-11.
2. Chapple IL, Matthews JB. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontol 2000*. 2007;43:160-232.
3. Schenkein HA, Loos BG. Inflammatory mechanisms linking periodontal diseases to cardiovascular diseases. *J Periodontol*. 2013;84(4 Suppl):S51-69.
4. Falcao A, Bullón P. A review of the influence of periodontal treatment in systemic diseases. *Periodontol 2000*. 2019;79(1):117-128.
5. Tomeno W, Imajo K, Takayanagi T, et al. Complications of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Extrahepatic Organs. *Diagnostics (Basel)*. 2020;10(11).
6. Alakhali MS, Al-Maweri SA, Al-Shamiri HM ve ark. The potential association between periodontitis and non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review. *Clin Oral Investig*. 2018;22(9):2965-2974.
7. Rosato V, Masarone M, Dallio M ve ark. NAFLD and Extra-Hepatic Comorbidities: Current Evidence on a Multi-Organ Metabolic Syndrome. *Int J Environ Res Public Health*. 2019;16(18).
8. Kuraji R, Ito H, Fujita M ve ark. Porphyromonas gingivalis induced periodontitis exacerbates progression of non-alcoholic steatohepatitis in rats. *Clin Exp Dent Res*. 2016;2(3):216-225.
9. Vasconcelos DF, Pereira da Silva FR, Pinto ME, et al. Decrease of Pericytes is Associated With Liver Disease Caused by Ligature-Induced Periodontitis in Rats. *J Periodontol*. 2017;88(2):e49-e57.
10. Lu Z, Li Y, Chowdhury N, et al. The Presence of Periodontitis Exacerbates Non-Alcoholic Fatty Liver Disease via Sphingolipid Metabolism-Associated Insulin Resistance and Hepatic Inflammation in Mice with Metabolic Syndrome. *Int J Mol Sci*. 2023;24(9).
11. Kuraji R, Sekino S, Kapila Y ve ark. Periodontal disease-related nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis: An emerging concept of oral-liver axis. *Periodontol 2000*. 2021;87(1):204-240.
12. Akinkugbe AA, Avery CL, Barritt AS, et al. Do Genetic Markers of Inflammation Modify the Relationship between Periodontitis and Nonalcoholic Fatty Liver Disease? Findings from the SHIP Study. *J Dent Res*. 2017;96(12):1392-1399.
13. Andrade RSB, França LFC, Pessoa LDS, et al. High-fat diet aggravates the liver disease caused by periodontitis in rats. *J Periodontol*. 2019;90(9):1023-1031.
14. Chen Y, Yang YC, Zhu BL ve ark. Association between periodontal disease, tooth loss and liver diseases risk. *J Clin Periodontol*. 2020;47(9):1053-1063.
15. Mortezaee K, Khanlarkhani N. Melatonin application in targeting oxidative-induced liver injuries: A review. *J Cell Physiol*. 2018;233(5):4015-4032.
16. Nabavi SM, Nabavi SF, Sureddi A, et al. Anti-inflammatory effects of Melatonin: A mechanistic review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2019;59(sup1):S4-s16.
17. Virto L, Cano P, Jiménez-Ortega V, et al. Melatonin as adjunctive therapy in the treatment of periodontitis associated with obesity. *J Clin Periodontol*. 2018;45(11):1336-1346.
18. Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(1):30-44.
19. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology 2000*. 2002;28(1):12-55.

20. Sanz M, Van Winkelhoff AJ, Periodontology WGotSEWo. Periodontal infections: understanding the complexity—consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *Journal of Clinical Periodontology*. 2011;38:3-6.
21. Bartold PM, Van Dyke TE. Host modulation: controlling the inflammation to control the infection. *Periodontol 2000*. 2017;75(1):317-329.
22. Kırzioğlu FY *Periodontal Hastalıkların Epidemiyolojisi İçinde: Çağlayan G (editör) Periodontoloji ve İmplantoloji, 1 Baskı İstanbul, Quintessence yayıncılık, 2018: 125-142.*
23. Armitage GC. The complete periodontal examination. *Periodontol 2000*. 2004;34:22-33.
24. Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17038.
25. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/oral-health> world health organization 2023.
26. Bouchard P, Carra MC, Boillot A ve ark. Risk factors in periodontology: a conceptual framework. *J Clin Periodontol*. 2017;44(2):125-131.
27. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of periodontology*. 1999;4(1):1-6.
28. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Periodontol*. 2018;89 Suppl 1:S1-s8.
29. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol*. 2018;89 Suppl 1:S159-s172.
30. Holtfreter B, Albandar JM, Dietrich T, et al. Standards for reporting chronic periodontitis prevalence and severity in epidemiologic studies: Proposed standards from the Joint EU/USA Periodontal Epidemiology Working Group. *J Clin Periodontol*. 2015;42(5):407-412.
31. Newman MG TH, Klokkevold PR, . Carranza FA. Carranza's clinical periodontology: Elsevier health sciences;. 2011.
32. Chapple ILC, Mealey BL, Van Dyke TE, et al. Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol*. 2018;89 Suppl 1:S74-s84.
33. Lang NP, Bartold PM. Periodontal health. *J Periodontol*. 2018;89 Suppl 1:S9-s16.
34. Huang S, Li Z, He T, et al. Microbiota-based Signature of Gingivitis Treatments: A Randomized Study. *Sci Rep*. 2016;6:24705.
35. Murakami S, Mealey BL, Mariotti A ve ark. Dental plaque-induced gingival conditions. *J Clin Periodontol*. 2018;45 Suppl 20:S17-s27.
36. Tonetti MS, Chapple IL, Jepsen S ve ark. Primary and secondary prevention of periodontal and peri-implant diseases: Introduction to, and objectives of the 11th European Workshop on Periodontology consensus conference. *J Clin Periodontol*. 2015;42 Suppl 16:S1-4.
37. Sheiham A. Is the chemical prevention of gingivitis necessary to prevent severe periodontitis? *Periodontol 2000*. 1997;15:15-24.
38. Haraszthy VI, Zambon JJ, Sreenivasan PK. The antimicrobial efficacy of commercial dentifrices. *Gen Dent*. 2010;58(1):50-55; quiz 56-57, 79-80.
39. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key

- changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol*. 2018;45 Suppl 20:S1-s8.
40. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol*. 2018;45 Suppl 20:S162-s170.
 41. Yucel-Lindberg T, Båge T. Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. *Expert Rev Mol Med*. 2013;15:e7.
 42. Di Benedetto A, Gigante I, Colucci S ve ark. Periodontal disease: linking the primary inflammation to bone loss. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:503754.
 43. PM P KP, Newman MG, Takei HH. Periodontal pathogenesis., İçinde:Newman MG CFeCscp, 12, Baskı. Elsevier Saunders -. Periodontal pathogenesis. İçinde:Newman MG, Carranza FA (editörler). Carranza's clinical periodontology, 12 Baskı. Elsevier Saunders,76-100. 2015.
 44. Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest*. 1976;34(3):235-249.
 45. Seymour GJ TL, Berglundh T. . Pathogenesis of Gingivitis. İçinde:Lang NP, Lindhe J (editörler). Clinical Periodontology and Implant Dentistry, 6 Baskı. Wiley Blackwell 241-255. 2015.
 46. Tatakis DN, Kumar PS. Etiology and pathogenesis of periodontal diseases. *Dent Clin North Am*. 2005;49(3):491-516, v.
 47. Kinane DF. Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2001;25:8-20.
 48. Amano A. Host-parasite interactions in periodontitis: microbial pathogenicity and innate immunity. *Periodontol 2000*. 2010;54(1):9-14.
 49. Azuma M. Fundamental mechanisms of host immune responses to infection. *J Periodontal Res*. 2006;41(5):361-373.
 50. Cekici A, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2014;64(1):57-80.
 51. PM P KP, Newman MG, Takei HH. Periodontal pathogenesis., İçinde:Newman MG CFeCscp, 12, Baskı. Elsevier Saunders.
 52. Cochran DL. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J Periodontol*. 2008;79(8 Suppl):1569-1576.
 53. Hienz SA, Paliwal S, Ivanovski S. Mechanisms of Bone Resorption in Periodontitis. *J Immunol Res*. 2015;2015:615486.
 54. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002;82(1):47-95.
 55. Valko M, Leibfritz D, Moncol J ve ark. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(1):44-84.
 56. Halliwell B, Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys*. 1990;280(1):1-8.
 57. Yanbeyi S. Aspirin ve antioksidant buthylated hydroxyanisoleün tavşanlarda eritrosit total katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri üzerine etkileri. 1999.
 58. Bullon P, Morillo JM, Ramirez-Tortosa MC ve ark. Metabolic syndrome and periodontitis: is oxidative stress a common link? *J Dent Res*. 2009;88(6):503-518.

59. de Pablo P, Chapple IL, Buckley CD, Dietrich T. Periodontitis in systemic rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2009;5(4):218-224.
60. Borgnakke WS, Chapple IL, Genco RJ, et al. The multi-center randomized controlled trial (RCT) published by the journal of the American Medical Association (JAMA) on the effect of periodontal therapy on glycated hemoglobin (HbA1c) has fundamental problems. *J Evid Based Dent Pract*. 2014;14(3):127-132.
61. Sfyroeras GS, Roussas N, Saleptsis VG ve ark. Association between periodontal disease and stroke. *J Vasc Surg*. 2012;55(4):1178-1184.
62. Mjaavatten MD, Bykerk VP. Early rheumatoid arthritis: the performance of the 2010 ACR/EULAR criteria for diagnosing RA. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2013;27(4):451-466.
63. Al-Rawi NH. Diabetes, oxidative stress, antioxidants and saliva: a review. *Oxid Stress Dis*. 2012:303-310.
64. Bullon P, Newman HN, Battino M. Obesity, diabetes mellitus, atherosclerosis and chronic periodontitis: a shared pathology via oxidative stress and mitochondrial dysfunction? *Periodontol 2000*. 2014;64(1):139-153.
65. Shackelford RE, Kaufmann WK, Paules RS. Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Radic Biol Med*. 2000;28(9):1387-1404.
66. Wang Y, Andrukhov O, Rausch-Fan X. Oxidative Stress and Antioxidant System in Periodontitis. *Front Physiol*. 2017;8:910.
67. Wang GP. Defining functional signatures of dysbiosis in periodontitis progression. *Genome Med*. 2015;7(1):40.
68. Almerich-Silla JM, Montiel-Company JM, Pastor S ve ark. Oxidative Stress Parameters in Saliva and Its Association with Periodontal Disease and Types of Bacteria. *Dis Markers*. 2015;2015:653537.
69. Johnstone AM, Koh A, Goldberg MB, Glogauer M. A hyperactive neutrophil phenotype in patients with refractory periodontitis. *J Periodontol*. 2007;78(9):1788-1794.
70. Khalili J, Biloklytska HF. Salivary malondialdehyde levels in clinically healthy and periodontal diseased individuals. *Oral Dis*. 2008;14(8):754-760.
71. Tsai CC, Chen HS, Chen SL, et al. Lipid peroxidation: a possible role in the induction and progression of chronic periodontitis. *J Periodontal Res*. 2005;40(5):378-384.
72. Tonetti MS. Periodontitis and risk for atherosclerosis: an update on intervention trials. *J Clin Periodontol*. 2009;36 Suppl 10:15-19.
73. Leira Y, Seoane J, Blanco M, et al. Association between periodontitis and ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Epidemiol*. 2017;32(1):43-53.
74. Xu S, Zhang G, Guo JF, Tan YH. Associations between osteoporosis and risk of periodontitis: A pooled analysis of observational studies. *Oral Dis*. 2021;27(2):357-369.
75. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem*. 2005;38(12):1103-1111.
76. Tuma DJ. Role of malondialdehyde-acetaldehyde adducts in liver injury. *Free Radic Biol Med*. 2002;32(4):303-308.
77. Kose O, Arabaci T, Kara A, et al. Effects of Melatonin on Oxidative Stress Index and Alveolar Bone Loss in Diabetic Rats With Periodontitis. *J Periodontol*. 2016;87(5):e82-90.

78. Baltacıoğlu E, Yuva P, Aydın G, et al. Lipid peroxidation levels and total oxidant/antioxidant status in serum and saliva from patients with chronic and aggressive periodontitis. Oxidative stress index: a new biomarker for periodontal disease? *J Periodontol*. 2014;85(10):1432-1441.
79. Esen C, Alkan BA, Kınap M, Akgül O, Işıkoğlu S, Erel O. The effects of chronic periodontitis and rheumatoid arthritis on serum and gingival crevicular fluid total antioxidant/oxidant status and oxidative stress index. *J Periodontol*. 2012;83(6):773-779.
80. Chen M, Cai W, Zhao S, et al. Oxidative stress-related biomarkers in saliva and gingival crevicular fluid associated with chronic periodontitis: A systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol*. 2019;46(6):608-622.
81. Dursun E, Akalin FA, Genc T, Cinar N, Erel O, Yildiz BO. Oxidative Stress and Periodontal Disease in Obesity. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(12):e3136.
82. Khoschsorur GA, Winklhofer-Roob B, Rabl H, Auer T, Peng Z, Schaur R. Evaluation of a sensitive HPLC method for the determination of malondialdehyde, and application of the method to different biological materials. *Chromatographia*. 2000;52:181-184.
83. Cobanoglu U, Demir H, Cebi A, et al. Lipid peroxidation, DNA damage and coenzyme Q10 in lung cancer patients--markers for risk assessment? *Asian Pac J Cancer Prev*. 2011;12(6):1399-1403.
84. Porter NA. Mechanisms for the autoxidation of polyunsaturated lipids. *Accounts of Chemical Research*. 1986;19(9):262-268.
85. Stehbens WE. Oxidative stress in viral hepatitis and AIDS. *Exp Mol Pathol*. 2004;77(2):121-132.
86. Hodgson PD, Aich P, Stookey J, et al. Stress significantly increases mortality following a secondary bacterial respiratory infection. *Vet Res*. 2012;43(1):21.
87. Rahal A, Kumar A, Singh V, et al. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *Biomed Res Int*. 2014;2014:761264.
88. Meister A, Larsson A. Glutathione synthetase deficiency and other disorders of the gamma-glutamyl cycle. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 1995;1:1461-1495.
89. Marrocco I, Altieri F, Peluso I. Measurement and Clinical Significance of Biomarkers of Oxidative Stress in Humans. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:6501046.
90. Mårtensson J, Lai JC, Meister A. High-affinity transport of glutathione is part of a multicomponent system essential for mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(18):7185-7189.
91. Chai YC, Ashraf SS, Rokutan K, Johnston RB, Jr., Thomas JA. S-thiolation of individual human neutrophil proteins including actin by stimulation of the respiratory burst: evidence against a role for glutathione disulfide. *Arch Biochem Biophys*. 1994;310(1):273-281.
92. Reed DJ, Fariss MW. Glutathione depletion and susceptibility. *Pharmacol Rev*. 1984;36(2 Suppl):25s-33s.
93. Griffith OW, Meister A. Glutathione: interorgan translocation, turnover, and metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76(11):5606-5610.
94. Hayes JD, McLellan LI. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res*. 1999;31(4):273-300.
95. Abdel-Misih SR, Bloomston M. Liver anatomy. *Surg Clin North Am*. 2010;90(4):643-653.

96. Tacke F, Luedde T, Trautwein C. Inflammatory pathways in liver homeostasis and liver injury. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2009;36(1):4-12.
97. Gao B, Jeong WI, Tian Z. Liver: An organ with predominant innate immunity. *Hepatology*. 2008;47(2):729-736.
98. Velázquez-Miranda E, Díaz-Muñoz M, Vázquez-Cuevas FG. Purinergic signaling in hepatic disease. *Purinergic Signal*. 2019;15(4):477-489.
99. Racanelli V, Rehmann B. The liver as an immunological organ. *Hepatology*. 2006;43(2 Suppl 1):S54-62.
100. Rinella M, Charlton M. The globalization of nonalcoholic fatty liver disease: Prevalence and impact on world health. *Hepatology*. 2016;64(1):19-22.
101. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2018;67(1):328-357.
102. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology*. 2012;55(6):2005-2023.
103. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology*. 2004;40(6):1387-1395.
104. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med*. 2002;346(16):1221-1231.
105. Tiniakos DG, Vos MB, Brunt EM. Nonalcoholic fatty liver disease: pathology and pathogenesis. *Annu Rev Pathol*. 2010;5:145-171.
106. Fang YL, Chen H, Wang CL, Liang L. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease in children and adolescence: From "two hit theory" to "multiple hit model". *World J Gastroenterol*. 2018;24(27):2974-2983.
107. Younossi ZM. Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis: Implications for liver transplantation. *Liver Transpl*. 2018;24(2):166-170.
108. Calzadilla Bertot L, Adams LA. The Natural Course of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Mol Sci*. 2016;17(5).
109. Pais R, Charlotte F, Fedchuk L, et al. A systematic review of follow-up biopsies reveals disease progression in patients with non-alcoholic fatty liver. *J Hepatol*. 2013;59(3):550-556.
110. Williams CD, Stengel J, Asike MI, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. *Gastroenterology*. 2011;140(1):124-131.
111. Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011;34(3):274-285.
112. Farrell GC, Wong VW, Chitturi S. NAFLD in Asia--as common and important as in the West. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013;10(5):307-318.
113. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016;64(1):73-84.
114. Zhu JZ, Dai YN, Wang YM, Zhou QY, Yu CH, Li YM. Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Economy. *Dig Dis Sci*. 2015;60(11):3194-3202.

115. Younossi ZM, Tampi R, Priyadarshini M, Nader F, Younossi IM, Racila A. Burden of Illness and Economic Model for Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis in the United States. *Hepatology*. 2019;69(2):564-572.
116. Day CP. Pathogenesis of steatohepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2002;16(5):663-678.
117. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*. 1998;114(4):842-845.
118. Yilmaz Y. Review article: is non-alcoholic fatty liver disease a spectrum, or are steatosis and non-alcoholic steatohepatitis distinct conditions? *Aliment Pharmacol Ther*. 2012;36(9):815-823.
119. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism*. 2016;65(8):1038-1048.
120. Polyzos SA, Kountouras J, Zavos C. Nonalcoholic fatty liver disease: the pathogenetic roles of insulin resistance and adipocytokines. *Curr Mol Med*. 2009;9(3):299-314.
121. Eslam M, Valenti L, Romeo S. Genetics and epigenetics of NAFLD and NASH: Clinical impact. *J Hepatol*. 2018;68(2):268-279.
122. Mahady SE, George J. Exercise and diet in the management of nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism*. 2016;65(8):1172-1182.
123. Polyzos SA, Kountouras J, Mantzoros CS. Adipose tissue, obesity and non-alcoholic fatty liver disease. *Minerva Endocrinol*. 2017;42(2):92-108.
124. Polyzos SA, Mantzoros CS. Nonalcoholic fatty future disease. *Metabolism*. 2016;65(8):1007-1016.
125. Mota M, Banini BA, Cazanave SC, Sanyal AJ. Molecular mechanisms of lipotoxicity and glucotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism*. 2016;65(8):1049-1061.
126. Koukias N, Buzzetti E, Tsochatzis EA. Intestinal hormones, gut microbiota and non-alcoholic fatty liver disease. *Minerva Endocrinol*. 2017;42(2):184-194.
127. Polyzos SA, Kountouras J, Deretzi G, Zavos C, Mantzoros CS. The emerging role of endocrine disruptors in pathogenesis of insulin resistance: a concept implicating nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Mol Med*. 2012;12(1):68-82.
128. Mazzocchi G, De Cosmo S, Mazza T. The Biological Clock: A Pivotal Hub in Non-alcoholic Fatty Liver Disease Pathogenesis. *Front Physiol*. 2018;9:193.
129. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology*. 1999;116(6):1413-1419.
130. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol*. 1999;94(9):2467-2474.
131. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005;41(6):1313-1321.
132. Jennison E, Patel J, Scorletti E, Byrne CD. Diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease. *Postgrad Med J*. 2019;95(1124):314-322.
133. Hernaez R, Lazo M, Bonekamp S, et al. Diagnostic accuracy and reliability of ultrasonography for the detection of fatty liver: a meta-analysis. *Hepatology*. 2011;54(3):1082-1090.
134. Browning JD. New imaging techniques for non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis*. 2009;13(4):607-619.

135. Iijima H, Moriyasu F, Tsuchiya K, et al. Decrease in accumulation of ultrasound contrast microbubbles in non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res.* 2007;37(9):722-730.
136. Dasarathy S, Dasarathy J, Khiyami A, Joseph R, Lopez R, McCullough AJ. Validity of real time ultrasound in the diagnosis of hepatic steatosis: a prospective study. *J Hepatol.* 2009;51(6):1061-1067.
137. Wieckowska A, Feldstein AE. Diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease: invasive versus noninvasive. *Semin Liver Dis.* 2008;28(4):386-395.
138. Schindhelm RK, Diamant M, Dekker JM, Tushuizen ME, Teerlink T, Heine RJ. Alanine aminotransferase as a marker of non-alcoholic fatty liver disease in relation to type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Diabetes Metab Res Rev.* 2006;22(6):437-443.
139. Amarapurkar DN, Patel ND. Clinical spectrum and natural history of non-alcoholic steatohepatitis with normal alanine aminotransferase values. *Trop Gastroenterol.* 2004;25(3):130-134.
140. Fracanzani AL, Valenti L, Bugianesi E, et al. Risk of severe liver disease in nonalcoholic fatty liver disease with normal aminotransferase levels: a role for insulin resistance and diabetes. *Hepatology.* 2008;48(3):792-798.
141. Mofrad P, Contos MJ, Haque M, et al. Clinical and histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT values. *Hepatology.* 2003;37(6):1286-1292.
142. Palekar NA, Naus R, Larson SP ve ark. Clinical model for distinguishing nonalcoholic steatohepatitis from simple steatosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Liver Int.* 2006;26(2):151-156.
143. Bedogni G, Bellentani S, Miglioli L, et al. The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterol.* 2006;6:33.
144. Ruhl CE, Everhart JE. Fatty liver indices in the multiethnic United States National Health and Nutrition Examination Survey. *Aliment Pharmacol Ther.* 2015;41(1):65-76.
145. Lee JH, Kim D, Kim HJ, et al. Hepatic steatosis index: a simple screening tool reflecting nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Liver Dis.* 2010;42(7):503-508.
146. Adams JM, Cory S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci.* 2001;26(1):61-66.
147. Adrain C, Martin SJ. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci.* 2001;26(6):390-397.
148. Spierings DC, de Vries EG, Vellenga E, et al. Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *J Histochem Cytochem.* 2004;52(6):821-831.
149. Wieckowska A, Zein NN, Yerian LM ve ark. In vivo assessment of liver cell apoptosis as a novel biomarker of disease severity in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2006;44(1):27-33.
150. Feldstein AE, Wieckowska A, Lopez AR ve ark. Cytokeratin-18 fragment levels as noninvasive biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis: a multicenter validation study. *Hepatology.* 2009;50(4):1072-1078.
151. Hsieh S, Leaderer BP, Feldstein AE, et al. Traffic-related air pollution associations with cytokeratin-18, a marker of hepatocellular apoptosis, in an overweight and obese paediatric population. *Pediatr Obes.* 2018;13(6):342-347.
152. Kucukoglu O, Guldiken N, Chen Y, et al. High-fat diet triggers Mallory-Denk body formation through misfolding and crosslinking of excess keratin 8. *Hepatology.* 2014;60(1):169-178.

153. Milić S, Lulić D, Štimac D. Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: biochemical, metabolic and clinical presentations. *World J Gastroenterol*. 2014;20(28):9330-9337.
154. Kanda H, Tateya S, Tamori Y, et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest*. 2006;116(6):1494-1505.
155. Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology*. 2010;52(5):1836-1846.
156. Carter-Kent C, Zein NN, Feldstein AE. Cytokines in the pathogenesis of fatty liver and disease progression to steatohepatitis: implications for treatment. *Am J Gastroenterol*. 2008;103(4):1036-1042.
157. Jepsen S, Suvan J, Deschner J. The association of periodontal diseases with metabolic syndrome and obesity. *Periodontol 2000*. 2020;83(1):125-153.
158. Maury E, Brichard SM. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;314(1):1-16.
159. Nokhbehsaim M, Keser S, Nogueira AV, et al. Leptin effects on the regenerative capacity of human periodontal cells. *Int J Endocrinol*. 2014;2014:180304.
160. Deschner J, Eick S, Damanaki A, Nokhbehsaim M. The role of adipokines in periodontal infection and healing. *Mol Oral Microbiol*. 2014;29(6):258-269.
161. Kardeşler L, Buduneli N, Cetinkalp S, Kinane DF. Adipokines and inflammatory mediators after initial periodontal treatment in patients with type 2 diabetes and chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2010;81(1):24-33.
162. Pradeep AR, Raghavendra NM, Prasad MV, Kathariya R, Patel SP, Sharma A. Gingival crevicular fluid and serum visfatin concentration: their relationship in periodontal health and disease. *J Periodontol*. 2011;82(9):1314-1319.
163. Akram Z, Rahim ZH, Taiyeb-Ali TB, et al. Resistin as potential biomarker for chronic periodontitis: A systematic review and meta-analysis. *Arch Oral Biol*. 2017;73:311-320.
164. Zhu J, Guo B, Gan X, et al. Association of circulating leptin and adiponectin with periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *BMC Oral Health*. 2017;17(1):104.
165. Watanabe N, Takai K, Imai K, et al. Increased levels of serum leptin are a risk factor for the recurrence of stage I/II hepatocellular carcinoma after curative treatment. *J Clin Biochem Nutr*. 2011;49(3):153-158.
166. Kitade M, Yoshiji H, Kojima H, et al. Leptin-mediated neovascularization is a prerequisite for progression of nonalcoholic steatohepatitis in rats. *Hepatology*. 2006;44(4):983-991.
167. Kamada Y, Nakamura T, Funahashi T, et al. Visceral obesity and hypoadiponectinemia are significant determinants of hepatic dysfunction: An epidemiologic study of 3827 Japanese subjects. *J Clin Gastroenterol*. 2009;43(10):995-1000.
168. Beauloye V, Zech F, Tran HT, Clapuyt P, Maes M, Brichard SM. Determinants of early atherosclerosis in obese children and adolescents. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(8):3025-3032.
169. Chow WS, Cheung BM, Tso AW, et al. Hypoadiponectinemia as a predictor for the development of hypertension: a 5-year prospective study. *Hypertension*. 2007;49(6):1455-1461.
170. Sculley DV, Langley-Evans SC. Salivary antioxidants and periodontal disease status. *Proc Nutr Soc*. 2002;61(1):137-143.

171. Liu Z, Liu Y, Song Y, Zhang X, Wang S, Wang Z. Systemic oxidative stress biomarkers in chronic periodontitis: a meta-analysis. *Dis Markers*. 2014;2014:931083.
172. Önder C, Kurgan Ş, Altıngöz SM, et al. Impact of non-surgical periodontal therapy on saliva and serum levels of markers of oxidative stress. *Clin Oral Investig*. 2017;21(6):1961-1969.
173. Martínez-Herrera M, Abad-Jiménez Z, Silvestre FJ, et al. Effect of Non-Surgical Periodontal Treatment on Oxidative Stress Markers in Leukocytes and Their Interaction with the Endothelium in Obese Subjects with Periodontitis: A Pilot Study. *J Clin Med*. 2020;9(7).
174. Matthews JB, Wright HJ, Roberts A, Cooper PR, Chapple IL. Hyperactivity and reactivity of peripheral blood neutrophils in chronic periodontitis. *Clin Exp Immunol*. 2007;147(2):255-264.
175. Dias IH, Matthews JB, Chapple IL, Wright HJ, Dunston CR, Griffiths HR. Activation of the neutrophil respiratory burst by plasma from periodontitis patients is mediated by pro-inflammatory cytokines. *J Clin Periodontol*. 2011;38(1):1-7.
176. Mester A, Ciobanu L, Taulescu M, et al. Periodontal disease may induce liver fibrosis in an experimental study on Wistar rats. *J Periodontol*. 2019;90(8):911-919.
177. Tomofuji T, Ekuni D, Sanbe T, et al. Effects of improvement in periodontal inflammation by toothbrushing on serum lipopolysaccharide concentration and liver injury in rats. *Acta Odontol Scand*. 2009;67(4):200-205.
178. Tomofuji T, Ekuni D, Yamanaka R, et al. Chronic administration of lipopolysaccharide and proteases induces periodontal inflammation and hepatic steatosis in rats. *J Periodontol*. 2007;78(10):1999-2006.
179. Tomofuji T, Ekuni D, Irie K, et al. Relationships between periodontal inflammation, lipid peroxide and oxidative damage of multiple organs in rats. *Biomed Res*. 2011;32(5):343-349.
180. Pessoa LS, Pereira-da Silva FR, Alves EH, et al. One or two ligatures inducing periodontitis are sufficient to cause fatty liver. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2018;23(3):e269-e276.
181. Dos Santos Carvalho J, Cardoso Guimarães Vasconcelos AC, Herlany Pereira Alves E, et al. Steatosis caused by experimental periodontitis is reversible after removal of ligature in rats. *J Periodontol Res*. 2017;52(5):883-892.
182. Yamamoto T, Tomofuji T, Tamaki N et al. Effects of topical application of lipopolysaccharide and proteases on hepatic injury induced by high-cholesterol diet in rats. *J Periodontol Res*. 2010;45(1):129-135.
183. Akinkugbe AA, Slade GD, Barritt AS, et al. Periodontitis and Non-alcoholic Fatty Liver Disease, a population-based cohort investigation in the Study of Health in Pomerania. *J Clin Periodontol*. 2017;44(11):1077-1087.
184. Widita E, Yoshihara A, Hanindriyo L, Miyazaki H. Relationship between clinical periodontal parameters and changes in liver enzymes levels over an 8-year period in an elderly Japanese population. *J Clin Periodontol*. 2018;45(3):311-321.
185. Shin HS, Hong MH, Moon JY, Sim SJ. Periodontal disease could be a potential risk factor for non-alcoholic fatty liver disease: An 11-year retrospective follow-up study. *Clin Oral Investig*. 2022;26(8):5503-5514.
186. Iwasaki T, Hirose A, Azuma T, et al. Correlation between ultrasound-diagnosed non-alcoholic fatty liver and periodontal condition in a cross-sectional study in Japan. *Sci Rep*. 2018;8(1):7496.

187. Akinkugbe AA, Barritt AS, Cai J, et al. Periodontitis and prevalence of elevated aminotransferases in the Hispanic Community Health Study/Study of Latinos. *J Periodontol*. 2018;89(8):949-958.
188. Hardeland R, Madrid JA, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin, the circadian multioscillator system and health: the need for detailed analyses of peripheral melatonin signaling. *J Pineal Res*. 2012;52(2):139-166.
189. Ohashi Y, Okamoto N, Uchida K, Iyo M, Mori N, Morita Y. Differential pattern of the circadian rhythm of serum melatonin in young and elderly healthy subjects. *Biol Signals*. 1997;6(4-6):301-306.
190. Zhao ZY, Xie Y, Fu YR, Bogdan A, Touitou Y. Aging and the circadian rhythm of melatonin: a cross-sectional study of Chinese subjects 30-110 yr of age. *Chronobiol Int*. 2002;19(6):1171-1182.
191. Cipolla-Neto J, Amaral FGD. Melatonin as a Hormone: New Physiological and Clinical Insights. *Endocr Rev*. 2018;39(6):990-1028.
192. Barrenetxe J, Delagrangé P, Martínez JA. Physiological and metabolic functions of melatonin. *J Physiol Biochem*. 2004;60(1):61-72.
193. Cipolla-Neto J, Amaral FG, Afeche SC, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin, energy metabolism, and obesity: a review. *J Pineal Res*. 2014;56(4):371-381.
194. Mauriz JL, Collado PS, Veneroso C, Reiter RJ, González-Gallego J. A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. *J Pineal Res*. 2013;54(1):1-14.
195. Dubocovich ML, Markowska M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine*. 2005;27(2):101-110.
196. Crisafulli C, Mazzon E, Muià C, et al. Effects of combination of melatonin and dexamethasone on acute lung injury in a mice model of carrageenan-induced pleurisy. *J Pineal Res*. 2006;41(3):228-237.
197. Minich DM, Henning M, Darley C, Fahoum M, Schuler CB, Frame J. Is Melatonin the "Next Vitamin D"? A Review of Emerging Science, Clinical Uses, Safety, and Dietary Supplements. *Nutrients*. 2022;14(19).
198. Cuesta S, Kireev R, Forman K, et al. Melatonin improves inflammation processes in liver of senescence-accelerated prone male mice (SAMP8). *Exp Gerontol*. 2010;45(12):950-956.
199. Carrillo-Vico A, Lardone PJ, Naji L, et al. Beneficial pleiotropic actions of melatonin in an experimental model of septic shock in mice: regulation of pro-/anti-inflammatory cytokine network, protection against oxidative damage and anti-apoptotic effects. *J Pineal Res*. 2005;39(4):400-408.
200. Cuesta S, Kireev R, García C, et al. Beneficial effect of melatonin treatment on inflammation, apoptosis and oxidative stress on pancreas of a senescence accelerated mice model. *Mech Ageing Dev*. 2011;132(11-12):573-582.
201. Chitimus DM, Popescu MR, Voiculescu SE, et al. Melatonin's Impact on Antioxidative and Anti-Inflammatory Reprogramming in Homeostasis and Disease. *Biomolecules*. 2020;10(9).
202. Mishra A, Paul S, Swarnakar S. Downregulation of matrix metalloproteinase-9 by melatonin during prevention of alcohol-induced liver injury in mice. *Biochimie*. 2011;93(5):854-866.
203. Renn TY, Huang YK, Feng SW, et al. Prophylactic supplement with melatonin successfully suppresses the pathogenesis of periodontitis through normalizing RANKL/OPG ratio and depressing the TLR4/MyD88 signaling pathway. *J Pineal Res*. 2018;64(3).

204. Kara A, Akman S, Ozkanlar S, et al. Immune modulatory and antioxidant effects of melatonin in experimental periodontitis in rats. *Free Radic Biol Med*. 2013;55:21-26.
205. Maria S, Witt-Enderby PA. Melatonin effects on bone: potential use for the prevention and treatment for osteopenia, osteoporosis, and periodontal disease and for use in bone-grafting procedures. *J Pineal Res*. 2014;56(2):115-125.
206. Kotlarczyk MP, Lassila HC, O'Neil CK, et al. Melatonin osteoporosis prevention study (MOPS): a randomized, double-blind, placebo-controlled study examining the effects of melatonin on bone health and quality of life in perimenopausal women. *J Pineal Res*. 2012;52(4):414-426.
207. Uslu S, Uysal A, Oktem G, Yurtseven M, Tanyalçin T, Başdemir G. Constructive effect of exogenous melatonin against osteoporosis after ovariectomy in rats. *Anal Quant Cytol Histol*. 2007;29(5):317-325.
208. Amstrup AK, Sikjaer T, Mosekilde L, Rejnmark L. Melatonin and the skeleton. *Osteoporos Int*. 2013;24(12):2919-2927.
209. Witt-Enderby PA, Slater JP, Johnson NA, et al. Effects on bone by the light/dark cycle and chronic treatment with melatonin and/or hormone replacement therapy in intact female mice. *J Pineal Res*. 2012;53(4):374-384.
210. Zhang L, Su P, Xu C, et al. Melatonin inhibits adipogenesis and enhances osteogenesis of human mesenchymal stem cells by suppressing PPAR γ expression and enhancing Runx2 expression. *J Pineal Res*. 2010;49(4):364-372.
211. Satomura K, Tobiume S, Tokuyama R, et al. Melatonin at pharmacological doses enhances human osteoblastic differentiation in vitro and promotes mouse cortical bone formation in vivo. *J Pineal Res*. 2007;42(3):231-239.
212. Park KH, Kang JW, Lee EM, et al. Melatonin promotes osteoblastic differentiation through the BMP/ERK/Wnt signaling pathways. *J Pineal Res*. 2011;51(2):187-194.
213. Koyama H, Nakade O, Takada Y, Kaku T, Lau KH. Melatonin at pharmacologic doses increases bone mass by suppressing resorption through down-regulation of the RANKL-mediated osteoclast formation and activation. *J Bone Miner Res*. 2002;17(7):1219-1229.
214. Rogers A, Eastell R. Circulating osteoprotegerin and receptor activator for nuclear factor kappaB ligand: clinical utility in metabolic bone disease assessment. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(11):6323-6331.
215. Liu J, Huang F, He HW. Melatonin effects on hard tissues: bone and tooth. *Int J Mol Sci*. 2013;14(5):10063-10074.
216. Wang C, Wang L, Wang X, Cao Z. Beneficial Effects of Melatonin on Periodontitis Management: Far More Than Oral Cavity. *Int J Mol Sci*. 2022;23(23).
217. Reiter RJ, Tan DX, Rosales-Corral S, Galano A, Zhou XJ, Xu B. Mitochondria: Central Organelles for Melatonin's Antioxidant and Anti-Aging Actions. *Molecules*. 2018;23(2).
218. Ahmed E, Shaker OG, Yussif N, Ghalwash DM. Effect of Locally Delivered Melatonin as an Adjunct to Nonsurgical Therapy on GCF Antioxidant Capacity and MMP-9 in Stage II Periodontitis Patients: A Randomized Controlled Clinical Trial. *Int J Dent*. 2021;2021:8840167.
219. Xie M, Tang Q, Nie J, et al. BMAL1-Downregulation Aggravates Porphyromonas Gingivalis-Induced Atherosclerosis by Encouraging Oxidative Stress. *Circ Res*. 2020;126(6):e15-e29.

220. Tekbas OF, Ogur R, Korkmaz A, Kilic A, Reiter RJ. Melatonin as an antibiotic: new insights into the actions of this ubiquitous molecule. *J Pineal Res.* 2008;44(2):222-226.
221. Srinivasan V, Mohamed M, Kato H. Melatonin in bacterial and viral infections with focus on sepsis: a review. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov.* 2012;6(1):30-39.
222. Srinath R, Acharya AB, Thakur SL. Salivary and gingival crevicular fluid melatonin in periodontal health and disease. *J Periodontol.* 2010;81(2):277-283.
223. Zhang D, Xu S, Wang Y, Zhu G. The Potentials of Melatonin in the Prevention and Treatment of Bacterial Meningitis Disease. *Molecules.* 2021;26(5).
224. Zhou W, Zhang X, Zhu CL, He ZY, Liang JP, Song ZC. Melatonin Receptor Agonists as the "Perioceutics" Agents for Periodontal Disease through Modulation of Porphyromonas gingivalis Virulence and Inflammatory Response. *PLoS One.* 2016;11(11):e0166442.
225. 2023. hwwin-rf-sdo-hwho.
226. Meenakshi SS, Malaiappan S. Role of melatonin in periodontal disease - A systematic review. *Indian J Dent Res.* 2020;31(4):593-600.
227. Tinto M, Sartori M, Pizzi I, Verga A, Longoni S. Melatonin as host modulating agent supporting nonsurgical periodontal therapy in patients affected by untreated severe periodontitis: A preliminary randomized, triple-blind, placebo-controlled study. *J Periodontal Res.* 2020;55(1):61-67.
228. Najeeb S, Khurshid Z, Zohaib S, Zafar MS. Therapeutic potential of melatonin in oral medicine and periodontology. *Kaohsiung J Med Sci.* 2016;32(8):391-396.
229. Reiter RJ, Rosales-Corral SA, Liu XY, Acuna-Castroviejo D, Escames G, Tan DX. Melatonin in the oral cavity: physiological and pathological implications. *J Periodontal Res.* 2015;50(1):9-17.
230. Permuy M, López-Peña M, González-Cantalapiedra A, Muñoz F. Melatonin: A Review of Its Potential Functions and Effects on Dental Diseases. *Int J Mol Sci.* 2017;18(4).
231. Köse O, Arabaci T, Kizildag A, et al. Melatonin prevents radiation-induced oxidative stress and periodontal tissue breakdown in irradiated rats with experimental periodontitis. *J Periodontal Res.* 2017;52(3):438-446.
232. Arabacı T, Kermen E, Özkanlar S, et al. Therapeutic Effects of Melatonin on Alveolar Bone Resorption After Experimental Periodontitis in Rats: A Biochemical and Immunohistochemical Study. *J Periodontol.* 2015;86(7):874-881.
233. Balaji TM, Varadarajan S, Jagannathan R, et al. Melatonin as a Topical/Systemic Formulation for the Management of Periodontitis: A Systematic Review. *Materials (Basel).* 2021;14(9).
234. Zare Javid A, Hosseini SA, Gholinezhad H, Moradi L, Haghighi-Zadeh MH, Bazyar H. Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of Melatonin in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus with Periodontal Disease Under Non-Surgical Periodontal Therapy: A Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2020;13:753-761.
235. Balaji TM, Varadarajan S, Jagannathan R, et al. Melatonin levels in periodontitis vs. the healthy state: A systematic review and meta-analysis. *Oral Dis.* 2022;28(2):284-306.
236. Anton DM, Martu MA, Maris M, et al. Study on the Effects of Melatonin on Glycemic Control and Periodontal Parameters in Patients with Type II Diabetes Mellitus and Periodontal Disease. *Medicina (Kaunas).* 2021;57(2).

237. de Oliveira PHC, Lemos CAA, Cantiga-Silva C, Faria FD, Cintra LTA, Pellizzer EP. Melatonin as an adjunctive treatment on dental procedures: A systematic review. *Oral Dis.* 2022;28(7):1770-1782.
238. Cutando A, Gómez-Moreno G, Villalba J, Ferrera MJ, Escames G, Acuña-Castroviejo D. Relationship between salivary melatonin levels and periodontal status in diabetic patients. *J Pineal Res.* 2003;35(4):239-244.
239. Cutando A, Galindo P, Gómez-Moreno G, et al. Relationship between salivary melatonin and severity of periodontal disease. *J Periodontol.* 2006;77(9):1533-1538.
240. Cutando A, López-Valverde A, de Diego RG, et al. Effect of topical application of melatonin to the gingiva on salivary osteoprotegerin, RANKL and melatonin levels in patients with diabetes and periodontal disease. *Odontology.* 2014;102(2):290-296.
241. Wang H, Wei W, Wang NP, et al. Melatonin ameliorates carbon tetrachloride-induced hepatic fibrogenesis in rats via inhibition of oxidative stress. *Life Sci.* 2005;77(15):1902-1915.
242. Farhan AR. Evaluation of melatonin hormone and nitric oxide levels in non-alcoholic fatty liver patients in relation to obesity and oxidative stress. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research.* 2018;10(5):1167-1169.
243. Cichoz-Lach H, Celinski K, Konturek PC, Konturek SJ, Slomka M. The effects of L-tryptophan and melatonin on selected biochemical parameters in patients with steatohepatitis. *J Physiol Pharmacol.* 2010;61(5):577-580.
244. Gonciarz M, Bielański W, Partyka R, et al. Plasma insulin, leptin, adiponectin, resistin, ghrelin, and melatonin in nonalcoholic steatohepatitis patients treated with melatonin. *J Pineal Res.* 2013;54(2):154-161.
245. Gonciarz M, Gonciarz Z, Bielanski W, et al. The effects of long-term melatonin treatment on plasma liver enzymes levels and plasma concentrations of lipids and melatonin in patients with nonalcoholic steatohepatitis: a pilot study. *J Physiol Pharmacol.* 2012;63(1):35-40.
246. Khajeh Jahromi S. *Comparison of the therapeutic effect of melatonin, metformin and vitamin E in patients with non-alcoholic fatty liver disease under a diet program*, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran; 2017.
247. Pakravan H, Ahmadian M, Fani A, Aghaee D, Brumanad S, Pakzad B. The Effects of Melatonin in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Randomized Controlled Trial. *Adv Biomed Res.* 2017;6:40.
248. Celinski K, Konturek PC, Slomka M, et al. Effects of treatment with melatonin and tryptophan on liver enzymes, parameters of fat metabolism and plasma levels of cytokines in patients with non-alcoholic fatty liver disease--14 months follow up. *J Physiol Pharmacol.* 2014;65(1):75-82.
249. Bahrami M, Cheraghpour M, Jafarirad S, et al. The effect of melatonin on treatment of patients with non-alcoholic fatty liver disease: a randomized double blind clinical trial. *Complement Ther Med.* 2020;52:102452.
250. Gulle K, Akpolat M, Kurcer Z, Cengiz MI, Baba F, Acikgoz S. Multi-organ injuries caused by lipopolysaccharide-induced periodontal inflammation in rats: role of melatonin. *J Periodontal Res.* 2014;49(6):736-741.
251. Ichimura M, Kawase M, Masuzumi M, et al. High-fat and high-cholesterol diet rapidly induces non-alcoholic steatohepatitis with advanced fibrosis in Sprague-Dawley rats. *Hepatol Res.* 2015;45(4):458-469.

252. Köse O, Kurt Bayrakdar S, Akyıldız K, et al. Melatonin ameliorates periodontitis-related inflammatory stress at cardiac left ventricular tissues in rats. *J Periodontol*. 2020;91(11):1486-1494.
253. Kose O, Kurt Bayrakdar S, Unver B, et al. Melatonin improves periodontitis-induced kidney damage by decreasing inflammatory stress and apoptosis in rats. *J Periodontol*. 2021;92(6):22-34.
254. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem*. 2004;37(4):277-285.
255. Yıldırım F, Sermetow K, Aycicek A, Kocyigit A, Erel O. Increased oxidative stress in preschool children exposed to passive smoking. *J Pediatr (Rio J)*. 2011;87(6):523-528.
256. Huang L, Huang L, Wang L, et al. Nonsurgical periodontal treatment improved the abnormal trimethylamine n-oxide metabolism in Apoe(-/-) mice with periodontitis. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2025;1871(5):167752.
257. Gan G, Luo Y, Zeng Y, et al. Gut microbiota dysbiosis links chronic apical periodontitis to liver fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease: Insights from a mouse model. *Int Endod J*. 2024;57(11):1608-1622.
258. Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Animal models for periodontal regeneration and peri-implant responses. *Periodontol 2000*. 2015;68(1):66-82.
259. Graves DT, Fine D, Teng YT, Van Dyke TE, Hajishengallis G. The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. *J Clin Periodontol*. 2008;35(2):89-105.
260. Bjornsson TD, Callaghan JT, Einolf HJ, et al. The conduct of in vitro and in vivo drug-drug interaction studies: a PhRMA perspective. *J Clin Pharmacol*. 2003;43(5):443-469.
261. Ekuni D, Yamamoto T, Yamanaka R, Tachibana K, Watanabe T. Proteases augment the effects of lipopolysaccharide in rat gingiva. *J Periodontal Res*. 2003;38(6):591-596.
262. Kuhr A, Popa-Wagner A, Schmoll H, Schwahn C, Kocher T. Observations on experimental marginal periodontitis in rats. *J Periodontal Res*. 2004;39(2):101-106.
263. Di Paola R, Mazzon E, Rotondo F, et al. Reduced development of experimental periodontitis by treatment with M40403, a superoxide dismutase mimetic. *Eur J Pharmacol*. 2005;516(2):151-157.
264. Konkel JE, O'Boyle C, Krishnan S. Distal Consequences of Oral Inflammation. *Front Immunol*. 2019;10:1403.
265. Hujoel PP, White BA, García RI, Listgarten MA. The dentogingival epithelial surface area revisited. *J Periodontal Res*. 2001;36(1):48-55.
266. Frank RM. Bacterial penetration in the apical pocket wall of advanced human periodontitis. *J Periodontal Res*. 1980;15(6):563-573.
267. Kuraji R, Wu YH, Hashimoto S, et al. Temporal and dynamic changes in gingival blood flow during progression of ligature-induced periodontitis. *Oral Dis*. 2020;26(6):1292-1301.
268. Volynets V, Küper MA, Strahl S, et al. Nutrition, intestinal permeability, and blood ethanol levels are altered in patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Dig Dis Sci*. 2012;57(7):1932-1941.
269. Canfora EE, Meex RCR, Venema K, Blaak EE. Gut microbial metabolites in obesity, NAFLD and T2DM. *Nat Rev Endocrinol*. 2019;15(5):261-273.

270. Kurt-Bayrakdar S, Kose O, Altin A, et al. Periodontitis exacerbates the renal degenerative effects of obesity in rats. *J Periodontal Res.* 2021;56(6):1058-1069.
271. Albuquerque-Souza E, Sahingur SE. Periodontitis, chronic liver diseases, and the emerging oral-gut-liver axis. *Periodontol 2000.* 2022;89(1):125-141.
272. Jiang W, Guo MH, Hai X. Hepatoprotective and antioxidant effects of lycopene on non-alcoholic fatty liver disease in rat. *World J Gastroenterol.* 2016;22(46):10180-10188.
273. Vasconcelos A, Vasconcelos DFP, Pereira da Silva FR, et al. Periodontitis causes abnormalities in the liver of rats. *J Periodontol.* 2019;90(3):295-305.
274. Tomofuji T, Sanbe T, Ekuni D, et al. Oxidative damage of rat liver induced by ligature-induced periodontitis and chronic ethanol consumption. *Arch Oral Biol.* 2008;53(12):1113-1118.
275. Hardeland R. Aging, Melatonin, and the Pro- and Anti-Inflammatory Networks. *Int J Mol Sci.* 2019;20(5).
276. Miguel FM, Picada JN, da Silva JB, et al. Melatonin Attenuates Inflammation, Oxidative Stress, and DNA Damage in Mice with Nonalcoholic Steatohepatitis Induced by a Methionine- and Choline-Deficient Diet. *Inflammation.* 2022;45(5):1968-1984.
277. Hatasa M, Yoshida S, Takahashi H, et al. Relationship between NAFLD and Periodontal Disease from the View of Clinical and Basic Research, and Immunological Response. *Int J Mol Sci.* 2021;22(7).
278. Pereira KKY, Jara CM, Antunes GL, et al. Effects of periodontitis and periodontal treatment on systemic inflammatory markers and metabolic profile in obese and non-obese rats. *J Periodontol.* 2022;93(9):1411-1420.
279. Chen F, Jiang G, Liu H, et al. Melatonin alleviates intervertebral disc degeneration by disrupting the IL-1 β /NF- κ B-NLRP3 inflammasome positive feedback loop. *Bone Res.* 2020;8:10.
280. Zhang Y, He F, Chen Z, et al. Melatonin modulates IL-1 β -induced extracellular matrix remodeling in human nucleus pulposus cells and attenuates rat intervertebral disc degeneration and inflammation. *Aging (Albany NY).* 2019;11(22):10499-10512.
281. Kuraji R, Shiba T, Dong TS, Numabe Y, Kapila YL. Periodontal treatment and microbiome-targeted therapy in management of periodontitis-related nonalcoholic fatty liver disease with oral and gut dysbiosis. *World J Gastroenterol.* 2023;29(6):967-996.
282. Hu ZP, Fang XL, Fang N, et al. Melatonin ameliorates vascular endothelial dysfunction, inflammation, and atherosclerosis by suppressing the TLR4/NF- κ B system in high-fat-fed rabbits. *J Pineal Res.* 2013;55(4):388-398.
283. Xu L, Li H, Zhang O, et al. Melatonin alleviates diet-induced steatohepatitis by targeting multiple cell types in the liver to suppress inflammation and fibrosis. *J Mol Endocrinol.* 2023;70(1).
284. Hardeland R. Melatonin and inflammation-Story of a double-edged blade. *J Pineal Res.* 2018;65(4):e12525.
285. Damanaki A, Nokhbehsaim M, Hiththetiya K, et al. Characterization of a diet-induced obesity rat model for periodontal research. *Clin Oral Investig.* 2019;23(2):937-946.
286. Auberval N, Dal S, Bietiger W, et al. Metabolic and oxidative stress markers in Wistar rats after 2 months on a high-fat diet. *Diabetol Metab Syndr.* 2014;6:130.

287. Blasco-Baque V, Garidou L, Pomié C, et al. Periodontitis induced by *Porphyromonas gingivalis* drives periodontal microbiota dysbiosis and insulin resistance via an impaired adaptive immune response. *Gut*. 2017;66(5):872-885.
288. Suciú M, Gruia AT, Nica DV, Azghadi SM, Mic AA, Mic FA. Acetaminophen-induced liver injury: Implications for temporal homeostasis of lipid metabolism and eicosanoid signaling pathway. *Chem Biol Interact*. 2015;242:335-344.
289. Wu Z, Yang F, Jiang S, Sun X, Xu J. Induction of Liver Steatosis in BAP31-Deficient Mice Burdened with Tunicamycin-Induced Endoplasmic Reticulum Stress. *Int J Mol Sci*. 2018;19(8).
290. Fadaei R, Poustchi H, Meshkani R, Moradi N, Golmohammadi T, Merat S. Impaired HDL cholesterol efflux capacity in patients with non-alcoholic fatty liver disease is associated with subclinical atherosclerosis. *Sci Rep*. 2018;8(1):11691.
291. Wang K, Shan S, Zheng H, Zhao X, Chen C, Liu C. Non-HDL-cholesterol to HDL-cholesterol ratio is a better predictor of new-onset non-alcoholic fatty liver disease than non-HDL-cholesterol: a cohort study. *Lipids Health Dis*. 2018;17(1):196.
292. Yoneda M, Naka S, Nakano K, et al. Involvement of a periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis* on the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol*. 2012;12:16.
293. Gao J, Symons AL, Bartold PM. Expression of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) in the developing periodontium of rats. *J Dent Res*. 1998;77(9):1708-1716.
294. E. K. Deneysel periodontitis oluşturulmuş ratlarda karvakrol uygulamasının periodontal dokular üzerine olan etkilerinin biyokimyasal, histolojik ve radyolojik olarak incelenmesi. Periodontoloji Ana Bilim Dalı Doktora Tezi. Erzurum, Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Periodontoloji Ana Bilim Dalı. 2014.
295. Bezirci D, Karsiyaka Hendek M, Ozcan G, Kul O, Anteplioglu T, Olgun E. Prophylactic and therapeutic effects of (6)-shogaol on alveolar bone loss in experimental periodontitis. *Eur Oral Res*. 2024;58(1):37-43.
296. Taubman MA, Valverde P, Han X, Kawai T. Immune response: the key to bone resorption in periodontal disease. *J Periodontol*. 2005;76(11 Suppl):2033-2041.
297. Gao L, Zhao Y, Wang P, et al. Detection of Th17/Treg cells and related factors in gingival tissues and peripheral blood of rats with experimental periodontitis. *Iran J Basic Med Sci*. 2017;20(3):294-300.
298. Chen P, Chen X, Chu H, et al. Periodontitis regulates renal impairment in obese mice via TGF- β /Smad pathway. *Am J Transl Res*. 2021;13(11):12523-12535.
299. Cao N, Liu X, Deng Y, Liu X, Xin Y, Yu W. Reactive oxygen species/c-Jun N-terminal kinase/nuclear factor kappa-B signaling molecules are involved in periodontitis-induced liver injury by regulating apoptosis. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2022;40(5):532-540.
300. Baydas G, Reiter RJ, Akbulut M, Tuzcu M, Tamer S. Melatonin inhibits neural apoptosis induced by homocysteine in hippocampus of rats via inhibition of cytochrome c translocation and caspase-3 activation and by regulating pro- and anti-apoptotic protein levels. *Neuroscience*. 2005;135(3):879-886.
301. Perdomo J, Cabrera J, Estévez F, Loro J, Reiter RJ, Quintana J. Melatonin induces apoptosis through a caspase-dependent but reactive oxygen species-independent mechanism in human leukemia Molt-3 cells. *J Pineal Res*. 2013;55(2):195-206.
302. Sheen JM, Chen YC, Hsu MH, et al. Melatonin Alleviates Liver Apoptosis in Bile Duct Ligation Young Rats. *Int J Mol Sci*. 2016;17(8).

303. San-Miguel B, Fernández-Palanca P, Mauriz JL, Tuñón MJ, González-Gallego J. Beneficial effects of melatonin on liver fibrosis: A systematic review of current biological evidence. *J Cell Physiol.* 2022;237(7):2740-2757.

EKLER

EK-1 ÖZGEÇMİŞ

A. KİŞİSEL BİLGİLER

Bu bölümde belirtilen tüm iletişim bilgilerinin güncel ve ulaşılabilir olması gerekmektedir.

Adı Soyadı	Akın Halil KOYUNCU
Akademik unvan/pozisyon	Arş. Gör.
Görev yeri	Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Hastanesi Periodontoloji Anabilim Dalı
Telefon numarası	
E-posta adresi	

B. EĞİTİM BİLGİLERİ

*Bu bölümde mezun olunan üniversite ve sonrasındaki eğitim bilgilerinizi yazınız.
Derece bölümü Uzmanlık, Doktora, Yüksek Lisans vb. şekilde belirtilmelidir.*

Yıl	Bölüm	Kurum	Derece
01.07.2020	Diş Hekimliği	Biruni Üniversitesi	Lisans
04.04.2021	Periodontoloji	Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi	Uzmanlık

C. İŞ TECRÜBESİNE AİT BİLGİLER

Bugüne kadar çalıştığınız kurum/kuruluşları tarih sırasına göre yazınız.

Tarih Aralığı	Kurum	Görev
15.09.2020- 15.03.2021	Özel Dent Elitium Ağız ve Diş Sağlığı Polikliniği	Diş Hekimi

EK-2 ETİK ONAY FORMU

T.C. RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU BAŞKANLIĞI ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI (Republic of Turkey Recep Tayyip Erdogan University Local Ethics Committee for Animal Experiments)			
BAŞVURU BİLGİLERİ (Application Information)	ETİK KURUL DOSYA NO(REFERENCE):211		
	ÇALIŞMANIN ADI	Deneyel Periodontitisli Ratlarda Sistemik Melatonin Uygulamasının Periodontitis İlişkili Nonalkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı Üzerine Etkilerinin İncelenmesi	
	Title	Investigation Of The Effects Of Systemic Melatonin Application On Periodontitis-Related Nonalcoholic Fatty Liver Disease In Rats With Experimental Periodontitis	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI (Director of Project)	Dr.Öğr.Üyesi Hatice YEMENOĞLU	
	DİĞER GÖREVLİLER (Researchers)	Akan Halil KOYUNCU, Semih Alperen BOSTAN, Oğuz KÖSE, Adnan YILMAZ, Sibel MATARACI KARAKAŞ	
	BAŞVURULAN ETİK KURUL	Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu	
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	☒ Tek Merkez Ulusal	☐ Çok Merkezli Ulusal	☐ Çok Merkezli Uluslararası

KARAR BİLGİLERİ	Karar No(Decision No):2024/47		Tarih (Date): 22.11.2024
	R.T.E. Üniversitesi Dış Hekimliği Fakültesi'nden, Dr.Öğr.Üyesi Hatice YEMENOĞLU'nun sorumluluğunda yürütülen ve yukarıda başvuru bilgileri verilen Hayvan Deneyleri Araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler, araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına katılan üyelerin oy birliğiyle karar verilmiştir.		
Decision Information	The study above has been approved by the Local Ethics Committee of Recep Tayyip Erdogan University.		
	☒ Accepted		☐ Rejected

ÜYELER (Members)						
Ünvanı/ Adı/ Soyadı Ek Üyeligi	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Doç.Dr. Atilla TOPÇU(Başkan)	Tıbbi Farmakoloji	Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Prof.Dr.Oğuz KÖSE (Başkan Vekili)	Periodontoloji	Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Dış Hekimliği Fakültesi	E	☒ E ☐ H	☒ E ☐ H	
Prof.Dr. Serkan GÜL (Üye)	Biyoloji	Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Prof.Dr.İlker Zeki KURTOĞLU(Üye)	Yetiştiricilik	Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Prof.Dr.Hülya KILIÇ(Üye)	Tıbbi Biyokimya	Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi	K	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	
Doç.Dr.Kazım ŞAHİN (Üye)	Tıbbi Mikrobiyoloji	Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Dr.Öğr.Üyesi Esra DENİZ (Üye)	Tıbbi Farmakoloji	Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Dr.Öğr.Üyesi Zehra TOPAL SUZAN (Üye)	Histoloji ve Embriyoloji	Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Şenay ÇAKIROĞLU (Üye)	Veteriner Hekim	Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Deney Hay. Arş. ve Uyg. Mer.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Ahmet ERKAN (Üye)	Sivil Toplum Kuruluşuna Üye	Sağlık-Sen	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Rukiye ÜLGER (Üye)	Serbest Çalışan	Sivil Üye	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	

*Araştırma ile ilişki(Relation to the project, E: Yes, H: No)

**Toplantıda Bulunma(Attendance, E: Yes, H: No)

ORJİNALLİK RAPORU

%18

BENZERLİK ENDEKSİ

%15

İNTERNET KAYNAKLARI

%9

YAYINLAR

%8

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

acikbilim.yok.gov.tr

İnternet Kaynağı

%3

2

abakus.inonu.edu.tr:8080

İnternet Kaynağı

%3

3

Submitted to Recep Tayyip Erdogan University

Öğrenci Ödevi

%2

4

dergipark.org.tr

İnternet Kaynağı

%1

5

9lib.net

İnternet Kaynağı

%1

6

openaccess.bezmialem.edu.tr

İnternet Kaynağı

%1

7

Submitted to The Scientific & Technological
Research Council of Turkey (TUBITAK)

Öğrenci Ödevi

%1

8

docplayer.biz.tr

İnternet Kaynağı

<%1

9

Submitted to Konya Necmettin Erbakan
University

Öğrenci Ödevi

<%1

10

hdl.handle.net

İnternet Kaynağı

<%1

11

studylib.net

İnternet Kaynağı

<%1

12

Submitted to Ankara University