



**EXENATİDE VE METFORMİNİN PERİAPİKAL LEZYONLARIN İYİLEŞMESİNE
ETKİSİ: HAYVAN DENEYİ ÇALIŞMASI**

Hasan ÖZTÜRK

ENDODONTİ ANABİLİM DALI

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Neslihan ŞİMŞEK**

Uzmanlık Tezi – 2019

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ**

**EXENATİDE VE METFORMİNİN PERİAPİKAL LEZYONLARIN
İYİLEŞMESİNE ETKİSİ: HAYVAN DENEYİ ÇALIŞMASI**

Hasan ÖZTÜRK

Endodonti Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Neslihan ŞİMŞEK**

Bu araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar ve Projeler Birimi tarafından TDH-2019-1700 proje numarası ile desteklenmiştir.

**MALATYA
2019**

İÇİNDEKİLER

ÖZET	v
ABSTRACT.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Periapikal Lezyonlar	3
2.2. Apikal Periodontitis	3
2.3. Diabetes Mellitus	5
2.4. Metformin	10
2.5. Exenatide (GLP-1 ve GLP-1 Reseptör Agonisti).....	11
2.6. Üç Boyutlu Görüntüleme ve Rekonstrüksiyon	12
2.6.1. Konik Işınlı Bilgisayarlı Tomografi	12
2.6.2. Mikro Bilgisayarlı Tomografi Görüntüleme Tekniği.....	13
3. MATERYAL VE METOT	15
3.1. Deney Hayvanları.....	15
3.2. Deney Grupları ve Kemik Reossifikasyon Modelinin Oluşturulması	16
3.3. Mikro Bilgisayarlı Tomografi Değerlendirmesi	20
3.4. Histokimyasal ve immunohistokimyasal numune hazırlıkları ve değerlendirme	23
3.4.1. Doku Örneklerinde Histokimyasal Çalışmalar	23
3.4.2. Doku Örneklerinde İmmunohistokimyasal Çalışmalar	25
3.5. İstatistiksel Analiz.....	28
4. BULGULAR.....	30
4.1. Mikro Bilgisayarlı Tomografi Bulguları	30
4.2. Histokimyasal Bulgular.....	33
4.3. İmmunohistokimyasal Bulgular	38
5. TARTIŞMA	45
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	52
KAYNAKLAR	53
EKLER.....	69
EK 1. Özgeçmiş	69
EK 2. Etik Kurul Onayı.....	70

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bütün akademik faaliyetlerimde ve eğitimim süresince yardım, öneri ve desteğini esirgemeyen, bana her zaman arkamda olduğunu hissettiren danışmanım Doç. Dr. Neslihan ŞİMŞEK'e;

Uzmanlık eğitimim boyunca klinik içinde ve dışında desteklerini ve yardımlarını asla esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Elçin TEKİN BULUT'a ve Dr. Öğr. Üyesi Levent AKINCI'ya,

Tezimin laboratuvar aşamasında büyük bir özveri ve içtenlikle bana yardımcı olan Onur ÖZKAYA ve Gamze ÖZKAYA'ya,

Tezimin histoloji kısmında bana yardımcı olan Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Dr. Meltem ÖZGÖÇMEN'e,

Uzmanlık eğitimim boyunca desteklerini hep hissettiğim Uzm. Dt. Oğuz TAVŞAN'a ve tüm çalışma arkadaşlarıma,

Yaşamımın her anında olduğu gibi uzmanlık eğitimim sırasında da sevgi ve desteklerini hiç eksik etmeyen sevgili aileme,

TEŞEKKÜR EDERİM

Hasan ÖZTÜRK

ÖZET

Exenatide ve Metforminin Periapikal Lezyonların İyileşmesine Etkisi: Hayvan

Deneyi Çalışması

Amaç: Bu çalışma, tip-2 diabetes mellitus tedavisinde kullanılan ve kemik metabolizmasına pozitif etkileri olduğu bilinen metformin ve exenatide ilaçlarının defekt bölgelerindeki kemik oluşumuna etkisini, mikro bilgisayarlı tomografi ve histolojik analizler yardımıyla değerlendirmeyi amaçlamaktadır.

Materyal ve Metot: Çalışmada 27 adet dişi Albino Wistar rat kullanıldı. Düşük devirli döner alet ve trefan frez ile hayvanların parietal kemiklerinde tek taraflı, 3.0 mm çapında ve 2 mm derinliğinde dairesel kraniyotomi defekti oluşturuldu. Hayvanlar rastgele üç gruba ayrıldı (n=9). Metformin grubuna 100 mg/kg/gün dozunda metformin intraoral yolla; exenatide grubuna 3 µg/kg/gün dozunda exenatide intraperitoneal yolla sistemik olarak verildi. Kontrol grubuna hiçbir ilaç uygulanmadı. Onuncu günün sonunda tüm hayvanlar yüksek doz anestezik kullanılarak sakrifiye edildi ve defekt bölgesini içeren kemikler diseke edildi. Kemikler mikro bilgisayarlı tomografi ile tarandı; yoğunluk ve hacim değerleri hesaplandı. Daha sonrasında örnekler histolojik analizlere tabi tutularak osteoblast ve osteoklast hücre varlığı, fibröz doku varlığı ve hasarlı bölgenin sağlam kemik dokusuna tam implantasyonu açısından değerlendirildi. Bulgular Kruskal-Wallis varyans analizi ve Conover testi ile analiz edildi. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular: Oluşan kemik hacmi ($p=0.317$), kemik yoğunluğu ($p=0.496$), fibröz bağ doku varlığı ($p=0.072$) ve hasarlı bölgenin asıl kemik dokuya tam implantasyonu ($p=0.386$) açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Metformin ve exenatide gruplarında kontrol gruplarına göre osteoblast ($p=0.007$) ve osteoklast ($p=0.007$) hücre varlığı açısından anlamlı fark görülmüştür.

Sonuçlar: Exenatide ve metformin ilaçları kemik hacmi ve yoğunluğu açısından kontrol grubuyla benzer etkiyi göstermiştir. Bununla birlikte osteoblastik ve osteoklastik hücre oluşumunu artırarak kemik iyileşmesini hızlandırmışlardır.

Anahtar Kelimeler: Exenatide, İmmunohistokimya, Metformin, Mikro Bilgisayarlı Tomografi, Periapikal Lezyonlar.

ABSTRACT

The Effect of Exenatide and Metformin on The Healing of Periapical Lesions:

Animal Experiment Study

Aim: The aim of this study is to evaluate the effects of metformin and exenatide drugs used in the treatment of type-2 diabetes mellitus on bone formation in the defect areas with the help of micro computed tomography and histological analysis.

Materials and Methods: In this study, 27 female Albino Wistar rats were used. One-sided, 3 mm diameter and 2 mm deep circular craniotomy defect was created in the parietal bones of the animals with low speed rotary instrument and trepan bur. Animals were randomly divided into three groups (n=9). The metformin group received 100 mg/kg/day metformin intraoral route; exenatide was administered intraperitoneally to the exenatide group at a dose of 3 µg/kg/day. No medication was administered to the control group. At the end of the tenth day, all animals were sacrificed using high dose anesthetic and the bones containing the defect site were separated. Bones were screened by microcomputed tomography; density and volume values were calculated. The samples were then subjected to histological analysis. The presence of osteoblast and osteoclast cells was evaluated for the presence of fibrous tissue and complete implantation of the damaged area into intact bone tissue. Results were analyzed by Kruskal-Wallis analysis of variance and Conover test. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results: There was no significant difference between the groups in terms of the resulting bone volume ($p=0.317$), bone density ($p=0.496$), presence of fibrous connective tissue ($p=0.072$), and complete implantation of the damaged area into the original bone tissue ($p=0.386$). There was a significant difference in metformin and exenatide groups in terms of osteoblast ($p=0.007$) and osteoclast ($p=0.007$) cells compared to control groups.

Conclusion: Exenatide and metformin drugs showed similar effect with respect to bone volume and density in the control group. However, they accelerated bone healing by increasing osteoblastic and osteoclastic cell formation.

Keywords: Exenatide, Immunohistochemistry, Metformin, Micro Computed Tomography, Periapical Lesions.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AMPK	: Adenozin 5'-monofosfat-aktive protein kinaz
°C	: Santigrat derece
CSF	: Hematopoetik büyüme faktörü
Dk	: Dakika
DI	: Desilitre
GIP	: Gastrik inhibitör polipeptit
GLP	: Glukagon benzeri peptid
IFN	: İnterferon
IL	: İnterlökin
M	: Median
Maks	: Maksimum
mg	: Miligram
Min	: Minimum
MKH	: mezenkimal kök hücreleri
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
OPG	: Osteoprotegerin
Ort	: Aritmetik Ortalama
RANKL	: Nükleer faktör kappa β ligandı reseptör aktivatörü
SS	: Standart Sapma
Th	: T helper
TNF	: Tümör nekroz faktörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No.	Sayfa No.
Şekil 3.1. Silindirik düşük hızlı trefan frez.....	16
Şekil 3.2. Parietal kemiklerinde oluşturulan tek taraflı dairesel defekt.....	17
Şekil 3.3. Glifor 1000 mg tablet.....	18
Şekil 3.4. Metforminin deneklere intraoral gavaj yoluyla verilmesi.....	18
Şekil 3.5. Byetta 10 mg/40 ml.....	19
Şekil 3.6. Exenatide ilacının intraperitoneal yolla uygulanması.....	19
Şekil 3.7. Defekt bölgesini içeren kemiğin çıkarılması.....	20
Şekil 3.8. Defekt bölgesini içeren kısmın Data Viewer programı yardımıyla seçilmesi.....	21
Şekil 3.9 Ham görüntünün CTan programı ile açılması.....	22
Şekil 3.10 Kemik defektini içeren bölümün ROI içine alınması.....	22
Şekil 4.1 Kontrol grubuna ait bir ham görüntü örneği.....	30
Şekil 4.2 Metformin grubuna ait bir ham görüntü örneği.....	31
Şekil 4.3 Exenatide grubuna ait bir ham görüntü örneği.....	31
Şekil 4.4 Kontrol grubuna ait hematoksilen – eozin ile boyanmış doku örneği (10x büyütme).....	35
Şekil 4.5. Kontrol grubuna ait hematoksilen – eozin ile boyanmış doku örneği (20x büyütme).....	36
Şekil 4.6. Metformin verilen grubuna ait hematoksilen – eozin ile boyanmış doku (10x büyütme).....	36
Şekil 4.7. Metformin verilen grubuna ait hematoksilen – eozin ile boyanmış doku (20x büyütme).....	37

Şekil 4.8. Exenatide verilen grubuna ait hematoksilin – eozin ile boyanmış doku (10x büyütme).....	37
Şekil 4.9. Exenatide verilen grubuna ait hematoksilin – eozin ile boyanmış doku (20x büyütme).....	38
Şekil 4.10. Kontrol grubuna ait RUNX ile boyanmış doku örnekleri (10x büyütme).....	39
Şekil 4.11. Kontrol grubuna ait RUNX ile boyanmış doku örnekleri (20x büyütme).....	39
Şekil 4.12. Metformin grubuna ait RUNX ile boyanmış doku örnekleri (10x büyütme).....	40
Şekil 4.13. Metformin grubuna ait RUNX ile boyanmış doku örnekleri (20x büyütme).....	40
Şekil 4.14. Exenatide grubuna ait RUNX ile boyanmış doku örnekleri (10x büyütme).....	41
Şekil 4.15. Exenatide grubuna ait RUNX ile boyanmış doku örnekleri (20x büyütme).....	41
Şekil 4.16. Kontrol grubuna ait Catepsin K ile boyanmış doku örnekleri (10x büyütme).....	42
Şekil 4.17. Kontrol grubuna ait Catepsin K ile boyanmış doku örnekleri (20x büyütme).....	42
Şekil 4.18. Metformin grubuna ait Catepsin K ile boyanmış doku örnekleri (10x büyütme).....	43
Şekil 4.19. Metformin grubuna ait Catepsin K ile boyanmış doku örnekleri (20x büyütme).....	43

Şekil 4.20. Exenatide grubuna ait Catepsin K ile boyanmış doku örnekleri (10x büyütme).....	44
Şekil 4.21. Exenatide grubuna ait Catepsin K ile boyanmış doku örnekleri (20x büyütme).....	44



TABLolar DİZİNİ

Tablo No.	Sayfa No.
Tablo 3.1. Mikro bilgisayarlı tomografi cihazının tarama parametreleri.....	20
Tablo 4.1. Yeni oluşan kemiklerin mm ³ cinsinden hacim değerlerinin gruplara göre karşılaştırılması.....	32
Tablo 4.2. Yeni oluşan kemiklerin gr/cm ³ cinsinden yoğunluk değerlerinin gruplara göre karşılaştırılması.....	32
Tablo 4.3. Yeni oluşan kemiklerde osteoblast, fibröz bağ doku, osteoklast varlığı ve hasarlı bölgenin sağlam kemik dokuya tam implantasyonunun gruplara göre karşılaştırılması	34

1. GİRİŞ

Periapikal enflamasyon; enfeksiyon, fiziksel ve iatrojenik travma ve endodontik tedaviyi takiben taşkın kök kanal dolgu malzemelerinin zarar verici etkileri dahil olmak üzere pulpa ve periapikal dokuların çeşitli irritanlarla uyarılması sonucu ortaya çıkar. Periapikal enflamatuvar yanıtlar en sık, etkilenen dişlerin köklerini çevreleyen kemiğin rezorpsiyonu ile birlikte, reaktif granülom ve kistler şeklinde görülür. Bu patolojik tepkiler, bazıları esas olarak pulpa ve periapikal bölgeyi korumak için etki edebilen, bazıları ise periapikal doku yıkımına, özellikle de kemik rezorpsiyonuna aracılık eden geniş bir immünolojik mekanizma dizisinin çalışmasını içerir. Periapikal enflamasyonun düzenlenmesi oldukça karmaşıktır. Antikor ve kompleman gibi immün bileşenler, sitokinler, araziidonik asit metabolitleri ve nöropeptitler gibi konakçı kaynaklı faktörler, periapikal enflamasyonun patogeneğinde rol oynar. Ekzojen antienflamatuvar ajanlar ve değişken biyolojik yanıtlar, periapikal yanıtların kapsamını ve şiddetini etkileyebilir (1).

Geçmişte yapılan araştırmalar periapikal lezyonun iyileşmesi için kök kanal enfeksiyonlarının elimine edilmesi gerektiğini göstermiştir. Bununla birlikte, standart tedavinin, biyofilm, smear tabakası ve kök kanal sisteminin karmaşıklıkları içinde mevcut olan mikroorganizmaları tamamen yok etmediği kabul edilmektedir (2). Ayrıca geçmiş araştırmalar, el eğeleri ve döner ege sistemleri kullanılarak yapılan kök kanal tedavilerinde, kök kanal sisteminin tamamen temizlenemediğini ve kullanılan eğelerin, kök kanal sisteminin %57'sine temas edemeyeceğini göstermiştir (3).

Metformin, nispeten ucuz ve iyi tolere edilen antihiperglisemik biguanid yapılı bir ilaçtır ve milyonlarca diyabetik hasta tarafından Tıp 2 diyabet için birinci basamak tedavi olarak yaygın şekilde reçete edilmektedir. Çeşitli çalışmalar, metforminin mezenkimal kök hücrelerin (MKH) ve preosteoblastların farklılaşmasını teşvik ederek

potansiyel bir osteojenik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca metformin glikasyon son ürünlerinin bu hücreler üzerindeki zararlı etkilerini de tersine çevirebilmektedir (4).

Kanazawa ve ark. (5), metforminin; adenozin 5'-monofosfat-aktive protein kinaz (AMPK) sinyal yolunu aktive ettiğini ve bu yolla preosteoblastların osteoblastik hücrelere farklılaşmasını ve osteoblastların mineralizasyonunu uyarabildiğini göstermiştir.

Exendin-4, doğal bir glukagon benzeri peptid-1 (GLP-1) reseptörü agonistidir, exenatide ise 39 aminoasitten oluşan sentetik bir GLP-1 agonistidir (6). Bazı çalışmalarda, bu ilaçların kemik metabolizması üzerindeki olumlu etkileri gösterilmiştir (7-9).

Metformin ve exenatide sıklıkla kullanılan antidiyabetik ilaçlardır ve daha önceki çalışmalarda osteoblastik aktiviteyi artırarak kemik yapımını hızlandırdığı gözlemlenmiştir. Fakat bu iki materyalin periapikal lezyonlar üzerindeki etkinliği üzerinde yapılan geniş literatür taraması sonrası bu iki ilacın etkisinin değerlendirildiği bir çalışma görülmemiştir. Çalışmamızda metformin ve exenatide ilaçlarının sistemik yolla alınmasının bu tarz lezyonlara etkilerinin incelenmesi hedeflenmektedir.

Yaptığımız geniş literatür taraması sonrasında ve planladığımız çalışma doğrultusunda metformin ve exenatidin sistemik yolla alınmasının periapikal lezyonların iyileşmesini hızlandıracağı hipotezi kurulmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Periapikal Lezyonlar

Sağlıklı dental pulpa, mine ve dentin tarafından oral mikroorganizmalardan korunur. Dental pulpanın bakteri ve yan ürünlerine antijen olarak etki etmesi, spesifik olmayan enflamatuvar tepkilerin yanı sıra periradiküler dokulardaki spesifik immünolojik reaksiyonlara neden olabilir (1, 10). Oluşan periradiküler lezyonlar, bakteriyel mücadeleye karşı lokal savunma reaksiyonlarının sonucudur. Periradiküler granülomlar, kronik lokal enflamasyonu takip eden onarıcı bir işlemi temsil ederken, periradiküler kistlerin granümatöz doku içinde veya bitişiğindeki epitelyal artıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir (11). Hem kistlerin hem de granülomların dokuları, lokal immünolojik cevaplarda rol alan spesifik ve spesifik olmayan hücreler tarafından süzülür. Periradiküler dokularda gerçekleşen lokal antijen sunumu, immün hücrelerin aktivasyonuna yol açar (12).

İmmünoaktif hücreler, antikorlar ve sitokinler de dahil olmak üzere enflamatuvar tepkiler için mediatörler üretir. Lokal antikor sentezi kapasitesi, antijene özgü immüniteye katkıda bulunur ve hastalığın ilerleyişinin kontrol altına alınmasında rol oynayabilir (13). Dahası hücre dağılımı ve lezyonların karakteri muhtemelen bu hücrelerin haberci molekülleri olan sitokinler tarafından düzenlenir, bu şekilde birçok hücrenin birbirleriyle olan ilişkileri düzenlenir (14).

2.2. Apikal Periodontitis

Apikal periodontitis, endodontik kökenli etiyolojik ajanların sebep olduğu ve periradiküler dokularda görülen enflamasyon ve yıkım olarak tanımlanabilir (15). Apikal periodontitis etiyolojisinde ekzojen ve endojen faktörler bulunmaktadır. Ekzojen faktörler; mikroorganizmaların toksinleri, zehirli metabolik ürünleri, kimyasal ajanlar,

mekanik irritasyon, yabancı cisimler ve travmadan oluşmaktadır. Endojen faktörler ise konak metabolik ürünlerini ve osteoklastların aktivasyonunu sağlayan sitokinler ile diğer enflamatuvar mediyatörleri kapsamaktadır (16).

Apikal periodontitis genellikle intraradiküler bir enfeksiyon tarafından üretilir. Tedavi, enfeksiyöz ajanların kök kanal tedavisi ile yok edilmesini ve böylece lezyonun iyileşmesini sağlar (17). Bununla birlikte, enfeksiyon tamamen ortadan kalkmadığında, periapikal lezyon tedavi başarısızlığı olarak kabul edilir. Apikal periodontitis, kök kanal sistemi doğru bir şekilde temizlenip doldurulduğunda bile iyileşmeden kalabilir. Bunun nedeni, geleneksel tekniklerle erişilemeyen, temizlenemeyen veya doldurulamayan aksesuar kanallara, isthmuslara ve anastomozlara sahip karmaşık kök kanal sistemidir. Ayrıca, periapikal aktinomikoz, taşkın kök kanal dolgusu ve diğer yabancı maddeler ile görülen yabancı cisim reaksiyonu, endojen kolesterol kristalleri gibi ekstraradiküler faktörler, apikal periodontitisin iyileşmesini engelleyebilir (18). Kök kanal tedavisinden sonra devam eden periapikal bir lezyonla karşılaşıldığında, asemptomatik olsa bile kök kanal tedavisinin yenilenmesi, endodontik cerrahi ile lezyonun elimine edilmesi veya etkilenen dişin çekilmesi düşünülmelidir (19).

Apikal periodontitis, kök kanal sistemi enfekte olmadan gelişebilir. Travmatik okluzyonile gelişen travmatik okluzyon, erken bir oklüzal temas sonucu periodontal ligamentte sürekli ve sabit irritasyona bağlı görülen enflamasyona bir örnektir (20, 21). Ağır oklüzal kuvvetler, intratübüler ve intrapulpal sıvının hareketini keser (22). Pulpa, nörojenik enflamasyon ile oklüzal travmaya cevap verir. Nöropeptid ekspresyonu, pulpa ve periodontal ligamentte artar (23). P maddesi, savunma mekanizması olarak mineralize doku oluşumu için gerekli olan anjiyogeneze önemli bir rol oynar (24).

Yoshinaga ve ark. (25) endotel hücrelerinde, enflamatuvar hücrelerde ve periodontal ligament hücrelerinde nükleer faktör kappa β ligandı reseptör aktivatörü

(RANKL) ekspresyonunun enflamatuvar kemik rezorpsiyonunda rol oynadığını ve travmatik okluzyonun RANKL ekspresyonunu arttırdığını göstermiştir. Bu sonuçlar, bu hücrelerdeki RANKL ekspresyonunun, oklüzal travma tarafından indüklenen osteoklastların artışına yakından dahil olduğunu göstermektedir.

Travma, iyileşmeyen bir kemik rezorpsiyonuna neden olan uzun süreli bir irritasyondur (26). Lüksasyon ve avulsiyon yaralanmaları gibi diğer travma biçimleri de apikal periodontitise neden olabilir (27, 28). Bu durumlarda, periodontal ligament doğrudan hasar görür ve tamamen kopması muhtemeldir. Akut enflamasyon, yaralanmaya verilen ilk tepkidir ve daha sonra dişin yeniden konumlandırılması ve stabilizasyonu sonrası akut enflamasyonu genellikle tamir takip eder. Tedavi yeterli değilse kronik enflamasyon ortaya çıkabilir (28).

Apikal periodontitiste görülen patolojik olaylardan biri de kemiğin ve diş sert dokularının yıkımıdır (15). Kemiğin tekrar şekillenmesi iki tip hücrenin koordineli aktivasyonu ile olur. Bu hücrelerden biri kemik yıkımından sorumlu osteoklastlar iken diğeri de canlı kemik oluşumunu sağlayan osteoblastlardır. Osteoblast ve osteoklast aktivitesi arasındaki dengenin bozulması osteoporoz gibi hastalıklara yol açar (29).

Osteoklastlar makrofaj/monosit orijinli, kemik yapısını bozan ve iskelet şeklini değiştiren hücrelerdir (30). Periapikal lezyonlarda kemik yıkımından osteoklastlar sorumludur ve osteoklast aktivitesi kemik kütlesindeki kaybın artışını belirler (31).

2.3. Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus; insülin sekresyonu, insülin etkisi veya her ikisindeki kusurların neden olduğu hiperglisemi ile karakterize bir metabolik hastalık grubudur (32). Diabetes mellitus; kardiyovasküler hastalıklar, nöropati, nefropati, retinopati, osteoporoz, Alzheimer hastalığı ve kanser dahil olmak üzere bir dizi komplikasyon ile ilişkili bulunmuştur. Dünyada 2017 yılı itibarıyla 451 milyon vakayla ciddi bir küresel

halk sağlığı yükü oluşturur ve bu sayının 2045 yılında 693 milyona çıkması beklenmektedir (33). İki ana tipi bulunmakta olup, tip 1 diabetes mellitus, insülin üretiminden sorumlu pankreas β hücrelerinin otoimmün yıkımının yetersiz insülin sekresyonuna yol açmasından kaynaklanır. Tip 2 diabetes mellitus; heterojen bir hastalık olup, patogenezinde insülin direnci, β -hücre si işlev bozukluğu ve karaciğer glukoz üretiminin artması gibi üç metabolik bozukluk sorumludur (34). Tip 2 diabetes mellitus, kan dolaşımındaki glikoz metabolizması bozukluğundan kaynaklanan hiperglisemi ve hiperinsülinemi gelişimi ile de ilişkilidir (35). Yüksek glukoz seviyeleri, makrofaj fonksiyonunu (kemotaksis, fagositoz ve bakteriyel ölüm) inhibe edebilir ve bu durum hücre sel proliferasyonu ve yara iyileşmesini engelleyen enflamatuvar bir reaksiyonla sonuçlanabilir (36). Tüm dünyada yetişkinlerde teşhis edilen tüm diyabet vakalarının yaklaşık %90-95'ine tip 2 diabetes mellitus teşhisi konmuştur (32).

Diabetes mellitus ağız dokularında büyük değişikliklere neden olarak ağız kuruluğu, tat duyusunun kaybı ve sialoz gibi geniş çeşitlilikte sonuçlar sunar. Ayrıca rk, periodontitis ve yumuşak doku lezyonları gibi hastalıkların ilerlemesini de etkileyebilir. Hastalar bakteri ve mantar enfeksiyonlarına eğilimlidir. Diabetes mellitus, özellikle hastalık kontrol altına alınamadığında, periapikal lezyonlara sahip endodontik enfeksiyonların iyileşmesini engelleyen bir faktör olarak belirtilmiştir (37-42). Son bulgular diabetes mellitus ile kronik periodontal hastalıklar (43), endodontik tedavinin başarısızlığı (44), apikal periodontitis prevalansının artması (45) ve endodontik tedaviye sahip dişlerin kaybındaki artış arasında bir bağlantı olduğunu göstermektedir (46). Periodontal hastalıklar son yirmi yılda, diabetes mellitusun “klasik” komplikasyonlarından biri olarak kabul edilmiştir (47).

Diabetes mellitusun pulpa bütünlüğüne doğrudan etkisi vardır ve zayıf glisemik kontrol bu ilişkiyi olumsuz yönde etkileyebilir. Hiperglisemi, pulpa yapılarında

çoğunlukla bozulmuş kollateral dolaşım nedeniyle farklı değişikliklere neden olabilir, bu da diş ağrısına ek olarak nekroz riskinin artmasına ve iskemiden kaynaklanan pulpa nekrozuna karşı eğilimin artmasına neden olur. Bunun yanında hastalık; kollajen konsantrasyonunda azalma, kan damarlarının bazal membranının kalınlığının artması, anjiyopati, yüksek kalsifikasyon sıklığı gibi pulpa dokusunda yapısal değişikliklere neden olabilir (40, 48).

Diyabetik olmayan hastalarda mikroorganizmalar ve nekrotik pulpanın metabolik ürünleri, periapikal dokuları etkiler, sert doku rezorpsiyonu ve periodontal ligament yıkımı ile kronik periapikal lezyona yol açar (49, 50). Periapikal doku-yanıt şiddeti, mikrobiyal hücrelerin sayısı ve virülansı ile doğrudan ilişkilidir (49). Pulpa mikroorganizmaları periapikal dokuya göç ettiklerinde, enfeksiyöz sürecin gelişimine karşı immüenflamatuvar bir cevap olarak polimorfonükleer nötrofiller veya epitelyal tıkaçlarla çevrilidirler. Periapikal enflamatuvar eksüda, mikroorganizmaları yok etmeyi amaçlayan çok sayıda immün yanıt hücresi içermektedir (51, 52). Bu eksüda, enflamatuvar yanıtta önemli rol oynayan, birkaç periapikal sitokin içerir. Bu sitokinler özellikle kemiğin yeniden şekillenmesi sürecine etki eden osteoklast hücrelerine etki eder (51). Tümör nekroz faktörü (TNF)- α , interferon (IFN)- γ , interleokin (IL)-2 (IL) ve tip 1 T helper hücreleri (Th1) tarafından üretilen IL-12 gibi sitokinler kemik rezorpsiyonunu aktive ederken, Tip 2 T helper hücreler (Th2) olarak kabul edilen IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 ve IL-13, kemik rezorpsiyonunu inhibe eder (50, 52). Enflamatuvar yanıtta yüksek glikoz seviyeleri, IL-4 ve osteoprotegerin (OPG) 'deki bir azalma (53) ve IL-4b, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-a ve RANKL artışı ile ilişkilendirilebilir (54-56). Bu antagonist etkileşim hipergliseminin kemiğin yeniden şekillenmesi üzerine etkisini açıklayabilir (57).

Kemik rezorpsiyon süreci iki aşamadan oluşur: osteoklastogenez ve osteoklast etkinliği. İlk aşamada, osteoklast öncüsü monosit / makrofaj, RANKL aktivitesi ile çok çekirdekli bir osteoklasta dönüşür. RANKL osteoblastlar, kemik iliği stromal hücreleri ve T lenfositler tarafından üretilir (58-60), ve ekspresyonu lezyon genişlemesiyle doğrudan orantılıdır (61). Kemik rezorpsiyon süreci, kemiğe bağlanan ve olgun osteoklastlara farklılaşmış çok çekirdekli hücreleri toplayan hematopoetik büyüme faktörü (CSF-1) ve RANKL sitokin etkisi ile başlar. Bu hücreler, katepsin K ve tartrateresistant asit fosfataz olarak kemik ve osteoklast bazal yüzeyi arasında protonlar ve litik enzimler salgırlar (62). Aksi takdirde, bir osteoblast tarafından üretilen protein olan ve RANK'a bağlanan OPG, RANK-RANKL bağlanmasını inhibe eder ve osteoklast maturasyonunu azaltabilir. Buna göre, RANKL ve OPG osteoklast aktivitesini düzenler (59); osteoporoz, osteopetroz, romatoid artrit, periodontal hastalık ve diş erüpsiyonunda kararsız seviyeler gösterir (50).

Diabetes mellitus ayrıca spesifik kemik matriks salgılanmasını etkileyen osteoblast oluşumunda azalmaları teşvik eder (63, 64). Çalışmalar, kemik rezorpsiyonu ve birikim dengesinin, aktif hücrelerin kapasitelerinden ziyade, sayısı ile daha fazla ilişkili olabileceğini göstermektedir. Kemik rezorpsiyon işlemi için ihtiyaç duyulan enerji ile ilgili olarak, bunun osteoklast veya yağ asidi oksidasyonu ile elde edildiği ileri sürülmüştür. Bununla birlikte, glikoz metabolizmasında yer alan osteoklastlarla ilgili başka bir çalışmada, laktat dehidrojenaz ve glikoz-6-fosfat dehidrojenaz gibi birçok enzim bulunmuştur (65). Ek olarak, osteoklast kültürleriyle glukoz taşınımı, kemikte, kemik harici kültürlerle kıyasla yaklaşık iki kat daha yüksektir. Bu veriler hiperglisemik koşullarda kemik rezorpsiyon seviyelerinin arttığı hipotezini güçlendirir (65). Hastalığın seyrini incelerken, diyabetik olmayan hastalara kıyasla kemik mineral yoğunluğunda

%10'dan daha fazla bir azalma olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, artmış kemik yoğunluğu tip 2 diabetes mellitus hastalarında sıklıkla görülür (63).

Daha önce yapılan bir çalışma, osteoklast farklılaşması sırasında glukoz metabolizmasının hızlanabileceğini ve diyabetik kemikte azalmış osteoblastlar bulunabileceğini göstermiştir (66). Osteoblastlarda görülen bu azalmaya, ozmotik strese karşı duyarlılıkları sebep olabilir (67). Kontrolsüz diyabeti olan hastalarda hiperkalsiüri ve kemik kaybı vardır. Bu hastalarda, kemik oluşumunun azalması ve kemik rezorpsiyonunun artması sonucu osteopeni görülebilir (68).

Diabetes mellitus hastalarında periapikal lezyonlarda kemik rezorpsiyonuna yönelik moleküler süreci daha iyi anlamak için, osteoklast ve osteoblast hücreleri kullanılarak birkaç in vitro çalışma yapılmıştır (36, 48, 63-65, 69, 70). Yüksek glukoz konsantrasyon ortamında yeni doğan sıçan kalvaria kemiğinin primer osteoblast proliferasyonunda, düşük glukoz konsantrasyonu ortamında bulunanlara kıyasla bir düşüş gözlenmiştir (70). Ayrıca, farklılaşmış osteoklast hücrelerini içeren çalışmalar, osteoklast aktivitesinin hiperglisemik koşullarda arttığını göstermiştir. Bu, glukozun osteoklastogenez sürecini inhibe edebileceğini ancak olgun osteoklast aktivitesini inhibe edemediğini gösterir (64).

Diabetes mellitus hastalarında periapikal patoloji konusunda, insan modellerinde tartışmalı sonuçlar gözlenmiştir. Periapikal dokudaki patojenlere karşı immün yanıtın azalması riskinin yanı sıra, kök kanalı tedavisinden sonra rezidüel lezyonlara karşı duyarlılığın arttığına dair kanıtlar vardır (71-73). Ek olarak, diğer klinik ve radyografik çalışmalar diyabetik hastalarda periapikal lezyon prevalansının diyabetik olmayan hastalara göre daha yüksek olduğunu bildirmiştir (36, 71, 74). Kontrolsüz diabetes mellitus hastalarında kök kanal tedavisi sonrası periapikal lezyon iyileşmeyip daha da ilerleyebilir (36, 75). Bu raporlar, düşük glikoz değerlerine sahip (70-89 mg/dL)

hastalarda %74'lük radyolüsensi azalmasına kıyasla, yüksek (90-110 mg/dL) plazma glukoz konsantrasyonundaki hastalarda periapikal radyolüsenside sadece %48'lik azalma gösteren klinik çalışmalarla desteklenmiştir (75). Diğer çalışmalarda da nekrotik pulpaya sahip kontrolsüz diabetes mellitus hastalarında kök kanal tedavisi sonrası artmış periapikal radyolüsensi gözlenmiştir (40).

2.4. Metformin

Metformin, tip 2 diabetes mellitusta kullanılan en yaygın oral hipoglisemik ilaçlardan biri olan bir biguanittir (76, 77). Metformin hem bazal hem de postprandiyal plazma glukozunu düşürür ve karaciğerdeki hepatik hücreler tarafından glukoz üretimini inhibe ederek çalışır; bağırsak hücreleri tarafından glukoz emilimi azalır ve glukoz alımı ve kullanımı geliştirilir (76-78). Plazma glukoz seviyesini düşürmenin yanı sıra metformin; ağırlıkta azalma, düşük plazma lipit seviyeleri ve bazı vasküler komplikasyonların önlenmesi gibi ek yararlarla sahip olabilir (77).

Önceki çalışmalar, metforminin, AMPK aktivasyonu ile glukoz metabolizmasını geliştirebileceğini göstermiştir (79, 80). AMPK'nin, kemik dahil her zaman ve her yerde eksprese edildiği ve kemik metabolizmasını etkileyebileceği bilinmektedir (81, 82).

Çeşitli çalışmalar metforminin, MKH ve preosteoblastların farklılaşmasını teşvik ederek potansiyel bir osteojenik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca metformin glikasyon son ürünlerinin bu hücreler üzerindeki zararlı etkilerini tersine çevirebilir (83-86). Kanazawa ve ark. (5), metforminin, AMPK sinyal yolunun aktivasyonu ile preosteoblastların osteoblastik hücrelere farklılaşmasını ve mineralleşmesini indükleyebildiğini göstermiştir.

Metforminin sistemik uygulamasının alveoler kemik rezorpsiyonu üzerindeki etkisi ve deneysel periapikal lezyonlara maruz kalan sıçanlarda RANKL / OPG'nin oranı, azalmış sayıda RANKL-pozitif hücre ve OPG-pozitif hücrelerde bir artış

göstermiştir ve metformin ile tedavi edilen gruptaki periapikal kemik kaybı alanı önemli ölçüde azalmıştır. Metformin, RANKL / OPG oranını düşürmenin bir sonucu olarak osteoklast sayısını ve kemik rezorpsiyon alanlarını azaltarak periapikal lezyonları inhibe eder (87).

2.5. Exenatide (GLP-1 ve GLP-1 Reseptör Agonisti)

Incretin hormonları, öncelikle glukoz metabolizması dahil olmak üzere birçok fizyolojik süreçte önemli bir rol oynayan ve gastrointestinal sistemden salgılanan bir grup hormondur. GLP-1 ve gastrik inhibitör polipeptit (GIP) bu grubun ana üyeleridir. GLP-1, glukagon sekresyonunu bastırırken glikoza bağımlı insülin sekresyonunu stimüle eden güçlü bir antihiperglisemik hormondur (88).

Kemik döngüsü yemeklerden elde edilen enerjinin harcanması ile karakterize dinamik bir olaydır. Özellikle geceleri ve besinlerin alınmamasına bağlı olarak kalsiyum sirkülasyonunun sağlanması sebebiyle kemik rezorpsiyonu görülmektedir. Besinler alındıktan sonra kemik rezorpsiyonu inhibe edilir ve önemsiz seviyelere geriler. Tüm bu olaylar besin alımından sonra gastro intestinal sistemde GLP-1 ve GIP gibi hormonların artmasına bağlı olarak görülmektedir (89).

Klinik öncesi araştırmalar, incretin hormonlarının kemiğin yeniden şekillendirilmesinde, kemik yapısı ve kuvveti üzerinde derin etkileri olabileceğini göstermektedir(9, 90). Hayvanlarda yapılan in vitro ve in vivo çalışmalar, esas olarak GIP'nin kemik rezorpsiyonunu inhibe ettiğini, GLP-1'in kemik oluşumunu desteklediğini, kemik rezorpsiyonunu önlediğini öne sürmektedir(91-93). Mevcut seyrek verilere dayanarak, GIP, ancak GLP-1'in insanda kemik yeniden şekillendirmesinde değişiklikler sağladığı görülmüştür (94). Yapılan çalışmalarda, oral antidiyabetik olarak kullanılan GLP-1 reseptör agonistlerinin kemik döngüsü üzerine olumlu etkilerinin olduğu bildirilmiştir. Bu amaçla geliştirilen 2 adet GLP-1 reseptör

agonisti bulunmaktadır. Exendin-4 doğal GLP-1 reseptör agonisti iken, exenatide ise sentetik GLP-1 agonistidir. Çeşitli çalışmalarda bu ilaçların kemik metabolizması üzerine olumlu etkilerinin bulunduğu gösterilmiştir (7-9).

2.6. Üç Boyutlu Görüntüleme ve Rekonstrüksiyon

X ışınları 1895'te Roentgen tarafından tanımlanmıştır. Bu zamandan itibaren diagnostik tıpta gelişme sağlamış ve vücudun görülmeyen kısımlarının görüntülenmesine imkân vermiştir. Bilgisayar destekli tomografi görüntüleme sistemleri ilk olarak 1970'lerin başında kullanılmaya başlanmıştır ve çok sayıda düzlemden toplanan görüntüler, farklı dokuların üç boyutlu görüntülerini oluşturmak amacıyla kullanılmaktadır (95). Görüntüleme yöntemleri diş hekimliğinde hastaların klinik muayenesi için çok değerli bir tamamlayıcıdır. İki boyutlu görüntüleme yöntemlerinde, istenmeyen geometrik bozulmalar görülebilmektedir. Üç boyutlu tarama cihazları voksel ile bozulmalara bağlı sorunları minimuma indirmiştir ve ölçülebilir hassaslıkta görüntüler oluşmasına olanak sağlamıştır (96). Yapılan çalışmalarda endodontik tedavi öncesi teşhis ve tedavi planlamasında üç boyutlu görüntüleme sistemlerinin avantajlarından bahsedilmiştir (97, 98).

2.6.1. Konik Işınlı Bilgisayarlı Tomografi

Konik ışınlı bilgisayarlı tomografi ilk defa 1982 yılında kardiyolojik değerlendirme amacı ile kullanılmıştır (99).

Konik ışınlı bilgisayarlı tomografi, diş hekimliğinde diş ve kemik gibi yüksek kontrastlı oluşumların görüntülenmesi için kullanılmaktadır. Konik ışınlı görüntü özellikle temporomandibular eklem, implant, çenelerin kemiksel ve dişsel hastalıkları, kök kanal sistemindeki anatomik varyasyonlar ve mevcut kök kanal tedavisinin

kalitesinin değerlendirilmesi gibi alanlarda fark yaratmaktadır. Bununla birlikte; kistler, tümörler, enfeksiyonlar, gelişimsel anomaliler, ortodontik problemlerin tespit ve takibinde, travmatik yaralanmaların incelenmesinde de yüksek çözünürlük özelliğinden yararlanılmaktadır. Konik ışınli bilgisayarlı tomografi ile birlikte çeşitli yazılım programlarının kullanımı önemli katkılar sağlar (100).

Periapikal lezyonların teşhisi, lokalizasyonu ve boyutlarının değerlendirilmesi endodontik tedavinin başarısı açısından son derece önemlidir (101). Konik ışınli bilgisayarlı tomografinin, numunenin sabit olup cihazın numune etrafında dönerek görüntü aldığı bir sistem olmasından dolayı deneysel endodontide konik ışınli bilgisayarlı tomografi ile mikro düzeyde görüntü alınamamaktadır. Tarama esnasında oluşan titreşimler çözünürlüğü azaltmaktadır. Bundan dolayı kök kanal sistemi gibi daha karmaşık ve küçük ölçekteki yapıları değerlendirmek oldukça zorlaşmaktadır. Bunun yerine mikro bilgisayarlı tomografi gibi x-ışını tarayıcısının ve dedektörün sabit olduğu ancak taranacak objenin kendi eksenini etrafında döndürüldüğü sistemlerde oluşan titreşimler azalır ve daha yüksek çözünürlüklü görüntüler ortaya çıkar (102).

2.6.2. Mikro Bilgisayarlı Tomografi Görüntüleme Tekniğı

Geleneksel bilgisayarlı tomografinin düşük çözünürlüğü diş ve kök kanal sistemi gibi küçük örneklerin rekonstrüksiyonu için yeterli değildir. Mikro bilgisayarlı tomografinin geliştirilmesi ile vertikal çözünürlük kapasitesi 100-200 µm'ye çıkmıştır. Son yıllarda çözünürlük sırasıyla; 81,36-68 ve 25-15 µm'ye kadar çıkarılmıştır. Şimdi ise 10 µm çözünürlüğün altına inilmiştir (103).

Mikro bilgisayarlı tomografide tarayıcının obje etrafında hareketi ile çok sayıda görüntü oluşturulabilir. Bu görüntüler 'X ray charge coupled device' kamera ve bunun bilgisayara aktarılması ile elde edilir. Programlar yardımıyla çok sayıda kesit elde edilir

ve birleştirilir. Böylece üç boyutlu görüntü oluşturulur. Mikro bilgisayarlı tomografi ve bilgisayarlı X ışınlı tomografide temel prensipler aynıdır (104).

Mikro bilgisayarlı tomografi kullanılarak yapılan üç boyutlu analizler yapılırken örnekler zarar görmez ve buna bağlı olarak veri kaybı oluşmaz. Mikro bilgisayarlı tomografi ile ilgili çalışmalarda genelde sert dokuların rekonstrüksiyonu değerlendirilmiştir. Yumuşak dokuların değerlendirilmesinde polimerlere ihtiyaç duyulur (105). Bu sistemdeki gelişmeler sayesinde yeni nesil cihazlarla canlı deney hayvanlarında *in vivo* görüntüleme yapılabilir (104, 106).



3. MATERYAL VE METOT

Bu tez çalışması; İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi, İnönü Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezi ve Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'na ait laboratuvarlarda gerçekleştirilmiştir. Çalışma için İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun 11/10/2018 tarih ve 2018/A-36 protokol numaralı kararı ile etik kurul izni alınmıştır.

3.1. Deney Hayvanları

Yapılan power analizinde $\alpha = 0.05$, $1-\beta$ (güç) = 0.80 alındığında; çalışmamızda kemik yapımının oluşmasında metformin ilacının uygulandığı grubun kontrol grubuna göre ortalama farklılığının 0.11, exenatide ilacının uygulandığı grubun kontrol grubuna göre ortalama farklılığının 0.08 olması için her bir gruptan en az 9'ar hayvanın çalışmaya alınması gerektiği hesaplandı.

Deneklerin kaç gün sonra sakrifiye edileceğinin belirlenmesi için yapılan pilot çalışmada her grupta 2 hayvan olmak üzere 6 hayvan kullanıldı. On beşinci günün sonunda hiçbir ilaç verilmeyen kontrol grubunda oluşturulan defektlerin tamamen iyileştiği görüldü ve yapacağımız histolojik değerlendirilmelerin kontrol grubuyla kıyaslanabilmesi için deneyin 10. Günde sonlandırılmasına karar verildi.

Çalışmamızda 27 adet 190-210 gr ağırlığında yetişkin dişi Wistar Albino Rat, İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezinden temin edilmiştir. Deney hayvanlarının tümü 21-23°C sabit ortam sıcaklığında, %55-60 nem sağlanan, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık olacak şekilde, yem ve su kısıtlamasının olmadığı kafesler içerisinde deney süresince barındırıldı.

Deney hayvanlarına anestezi için intraperitoneal olarak enjekte edilen %10 Ketamin (Alfamine %10, Alfasan International BV, Woerden, Hollanda) / %2 Xylazin (Xylazin Bio %2, Bioveta, Çek Cumhuriyeti) uygulandı ve kontrol edildi. Çalışma alanında kullanılacak aletler daha önceden otoklavda steril edildi.

3.2. Deney Grupları ve Kemik Reossifikasyon Modelinin Oluşturulması

Serum fizyolojik soğutmalı düşük devirli döner alete (35.000 devir/dk) silindirik düşük hızlı trefan frez (Otto Leibinger, Almanya) (Şekil 3.1) ile hayvanların parietal kemiklerinde tek taraflı, 3.0 mm çapında ve 2.0 mm derinliğinde dairesel kraniyotomi defekti oluşturuldu (Şekil 3.2) (107). Daha sonra defekt bölgesi ipek sütur kullanılarak primer olarak kapatıldı.



Şekil 3.1. Silindirik düşük hızlı trefan frez (Otto Leibinger, Almanya)



Şekil 3.2. Parietal kemiklerinde oluşturulan tek taraflı dairesel defekt

Hayvanlar rastgele üç gruba ayrıldı.

Grup 1: Kontrol grubu (n=9)

Grup 2: Metformin grubu (n=9)

Grup 3: Exenatide grubu (n=9)

Metformin grubundaki hayvanlara her gün, günde bir defa üzere olmak üzere 100 mg/kg/gün dozunda metformin (Glifor 1000 mg tablet, Bilim İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş., İstanbul, Türkiye) (Şekil 3.3) intraoral yolla sistemik olarak verildi (Şekil 3.4).



Şekil 3.3. Glifor 1000 mg tablet (Bilim İlaç Sanayi, İstanbul, Türkiye)



Şekil 3.4. Metforminin deneklere intraoral gavaj yoluyla verilmesi

Exenatide grubundaki hayvanlara her gün, günde bir defa olmak üzere 3 $\mu\text{g/kg/gün}$ dozunda exenatide (Byetta 10 mg/40 ml, AstraZeneca, Cambridge, Britanya) (Şekil 3.5) intraperitoneal yolla sistemik olarak verildi (Şekil 3.6).



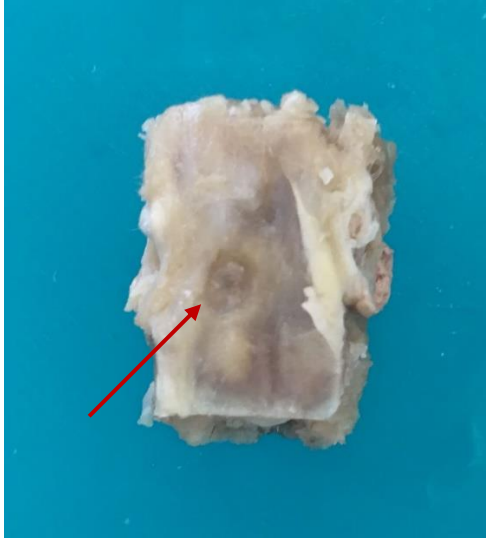
Şekil 3.5. Byetta 10 mg/40 ml, AstraZeneca, Cambridge, Britanya



Şekil 3.6. Exenatide ilacının intraperitoneal yolla uygulanması

Kontrol grubundaki hayvanlara ise hiçbir ilaç uygulanmadı.

Çalışmanın 10. gününün sonunda tüm hayvanlar yüksek doz anestezi kullanılarak sakrifiye edildi ve defekt bölgesini içeren parietal kemikler çıkarıldı (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Defekt bölgesini içeren kemiğin çıkarılması (kırmızı ok defekt bölgesini göstermektedir).

3.3. Mikro Bilgisayarlı Tomografi Değerlendirmesi

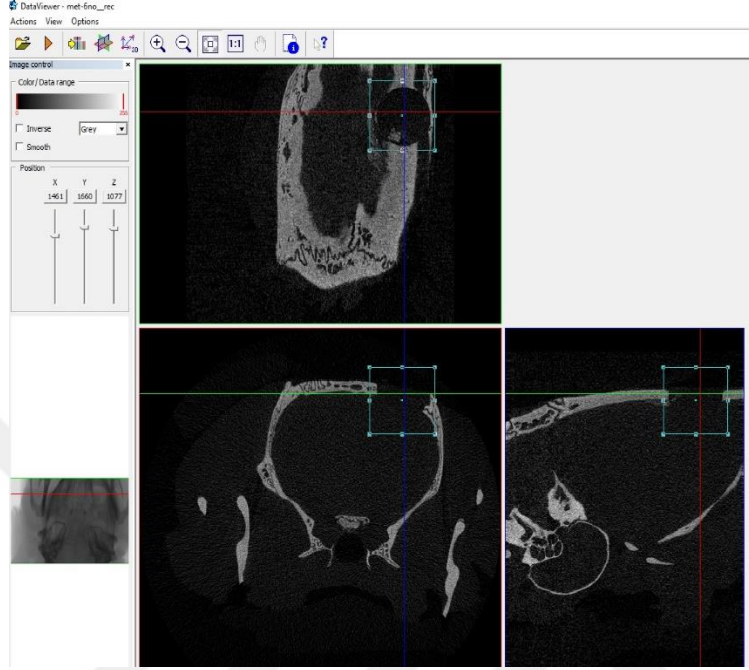
Örnekler tarama için SkyScan 1172 Micro-CT (Kontich, Belçika) cihazının numune tutucusuna yerleştirildi. Daha sonra cihazın kapağı kapatıldı ve cihazın içinde bulunan kamera yardımı ile örneğin konumu kontrol edildi.

Tablo 3.1. Mikro bilgisayarlı tomografi cihazının tarama parametreleri

Kv :	80
Amper:	124
Çözünürlük (μm):	13.68
Dönme adımı :	0,600
Işınlama zamanı (dk.) :	24:52
Frame averaging :	1
Filtre :	0.5 mm Alüminyum

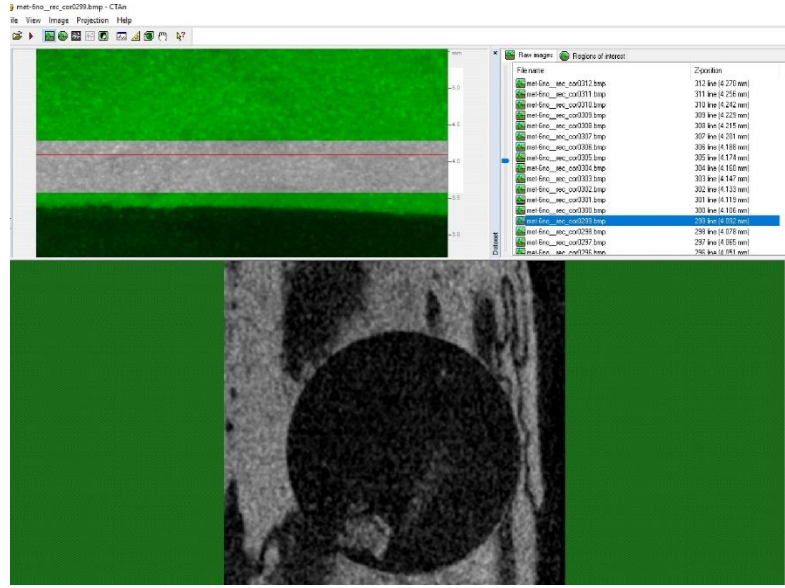
Elde edilen görüntüler TIFF (Tagged Image File Formatı) formatıyla kaydedildi. Bu görüntüler NRecon rekonstrüksiyon yazılımı (v.1.6.10.5. Skyscan, Kontich, Belçika) kullanılarak 250-300 kesit oluşturulacak şekilde rekonstrükte edildi. NRecon programında ilgi alanı (ROI) daire seçildi ve örneğin tamamı ilgi alanı içerisinde kaldı. Seçilen görüntüler TIFF formatından BMP formatına çevrildi.

3B görüntüleme ve analiz için kemik defektini içine alacak yaklaşık 4-5 mm'lik kısım DataViewer programı (v.1.5.2.7.;Skyscan, Kontich, Belçika) yardımı ile seçildi. (Şekil 3.8).

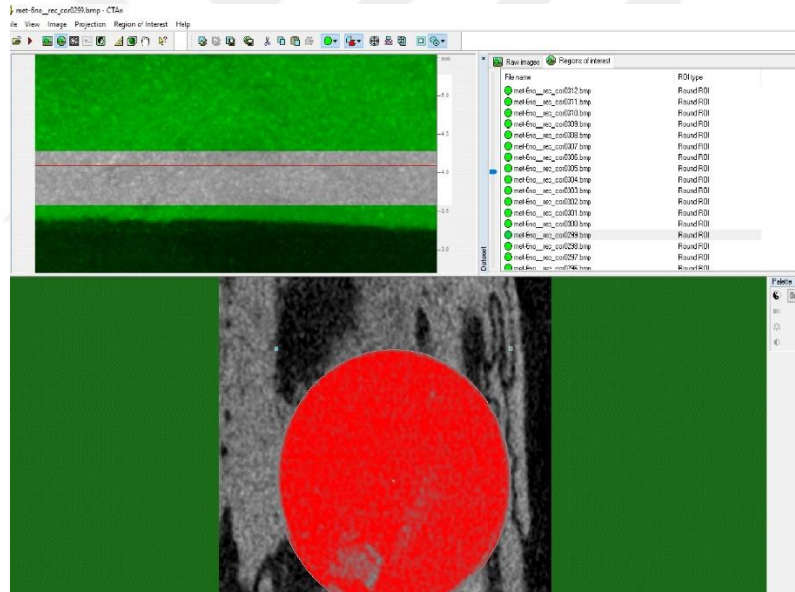


Şekil 3.8. Defekt bölgesini içeren kısmın DataViewer programı yardımıyla seçilmesi.

Daha sonra kaydedilen bu görüntüler CT analyser (CTAn;v.1.16.4.1.;Skyscan, Kontich, Belçika) programında açıldı. CTAn programında açılan ham görüntü sayfasında kesitler üzerinde hesaplama için örnek üzerinde ilgili bölüm seçildi (Şekil 3.9). Bu programda kemik defektinin bulunduğu kısım ROI içerisine alındı (Şekil 3.10).



Şekil 3.9. Ham görüntünün CTan programı ile açılması.



Şekil 3.10. Kemik defektini içeren bölümün ROI içine alınması.

Daha sonra CTAn programında görüntülerin 3B analizi yapılması için gerekli bölümler açıldı. Ölçüm yapılabilmesi için değerlendirilecek yapının doğru tresholding değerleri girildi. Bu değerlere göre ölçüm yapıldı.

Yoğunluk hesaplamasında 0.25 ve 0.75 yoğunluk değerlerine sahip 2 farklı fantom çubuğu Mikro-BT cihazının içinde örnekler ile aynı parametrelerde su dolu bir

numune tutucu içerisinde tarandı. Her bir fantom çubuğu ayrı ayrı ilgi alanı içine alınarak yoğunluk değerleri kaydedildi. Çıkan bu değerler 0.25 ve 0.75 kalibrasyon değerleri olarak girildi ve kaydedildi. Daha sonra taranan örnekler CTAn programında tekrar açıldı ve yoğunluk ve hacim değerleri hesaplandı.

3.4. Histokimyasal ve immunohistokimyasal numune hazırlıkları ve değerlendirme

3.4.1. Doku Örneklerinde Histokimyasal Çalışmalar

3.4.1.1. Doku Takip Çalışmaları, Kesitlerin Elde Edilmesi

En az 48 saat %10 nötral formalin solüsyonu içerisinde fiksasyonu sağlanan doku örnekleri, dekalsifikasyon için %10'luk formik asit çözeltisi içerisine alındı. 6-7 haftalık dekalsifikasyon işlemi süresince solüsyonlar 10 günde bir yenilendi. Dekalsifikasyonu takiben, bir gece akan suda yıkama işlemine tâbi tutulduktan sonra sırasıyla aşağıdaki işlemlerden geçirildi.

a) Suyun dokulardan uzaklaştırılması (Dehidratasyon)

Dokular dereceli alkollerde sırasıyla belirtilen sürelerde bekletildi.

<u>Alkol derecesi</u>	<u>Süre</u>
%50	1 saat bekletildi.
%70	1 saat bekletildi.
%80	1 saat bekletildi.
%90	1 saat bekletildi.
%96	1 saat bekletildi.
%100	1 saat bekletildi.
%100	1 saat bekletildi.

%100 1 saat bekletildi.

b) Şeffaflandırma

Ksilolde 3-10 dk (Her 3 dk da bir kontrol edilerek işlem sonlandırıldı).

c) Parafin Emdirme

Sıvı parafin (60°C etüvde) 30 dk bekletildi.

Katı parafin (oda sıcaklığında) 1 gece bekletildi.

d) Gömme

Sert parafin, içerisine gömülen dokularla bloklar halinde hazırlandı.

e) Kesit alma

Hazırlanan parafin bloklardan kızaklı mikrotom kullanılarak 4 mikron kalınlığında kesitler alındı.

3.4.1.2. Kesitlerin Hematoksilen-Eozin ile Boyanması (H-E)

Histokimyasal değerlendirme için preparatlara Hematoksilen- Eozin ile rutin boyama yapıldı. Uygulanan boyama protokolü sırasıyla aşağıda belirtilmiştir.

Yapılan işlem

Süre

1. Deparafinizasyon

A) 60 °C etüv 45 dk bekletildi.

B) Ksilol I 20 dk bekletildi.

C) Ksilol II 20 dk bekletildi.

2. Alkol serisi

A) %96 10 dk bekletildi.

B) %90 10 dk bekletildi.

C) %80 10 dk bekletildi.

- | | |
|---|---|
| D) %70 | 10 dk bekletildi. |
| 3. Distile Su | 5 dk bekletildi. |
| 4. Hematoksilen | 2 dk bekletildi. |
| 5. Çeşme suyu | 5 dk bekletildi, sonra 2-3 tur akan suda yıkandı. |
| 6. Asit alkol | 3-4 sn |
| 7. Çeşme suyu | 5 dk bekletildi, sonra 2-3 tur akan suda yıkandı. |
| 8. Eozin | 2 dk bekletildi. |
| 9. Çeşme suyu | 5 dk sonra 2-3 tur akan suda yıkandı. |
| 10. %70- %80- %90 alkol serisinden sırasıyla batır çıkar yaparak geçirildi. | |
| 11. Ksilol | 1 gece bekletildi. |
| 12. Kapatma (Entellan) | |

3.4.2. Doku Örneklerinde İmmünohistokimyasal Çalışmalar

3.4.2.1. Doku Takip Çalışmaları, Kesitlerin Elde Edilmesi

Fiksasyonu sağlanan dokulara yukarıda sayılan doku takip işlemleri sırasıyla uygulanarak dokular parafine gömüldü. Kızaklı mikrotom ile lizinli lama 4 µm kalınlığında seri kesitler alındı.

3.4.2.2. İmmünohistokimyasal Boyama

3.4.2.2.1. İmmünohistokimyasal Boyamada Kullanılan Kimyasalların Hazırlanışı

Primer (Çoğul Klonlu-Poliklonal) Antikor:

-**Anti-RUNX2** (Anti-mouse monoklonal anti-RUNX2 antibody, Abcam), antikor dilüsyon solüsyonu ile 1:50 oranında sulandırıldı, osteoblastları işaretler.

-**Anti-Cathepsin K** (Anti-rabbit poliklonal Anti-Cathepsin antibody, Abcam), antikor dilüsyon solüsyonu ile 1:50 oranında sulandırıldı, osteoklastları işaretler.

Sekonder antikor:

SensiTek Anti-Polyvalent Biotinylated Antibody, hazır solüsyon şeklinde kullanıldı.

Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS; Phosphate Buffer Solution 25X):

Seyreltme çözeltisi olarak kullanıldı. 1500 ml distile suya 500 ml PBS karıştırılarak hazırlandı. Her boyama için taze solüsyon hazırlandı.

Sodyum Sitrat Solüsyonu (Citrate Buffer 10X):

450 ml distile suya 50 ml Citrate Buffer solüsyonu karıştırılarak hazırlandı. Her boyama için taze solüsyon hazırlandı.

Hidrojen Peroksit Solüsyonu (%3):

Hazır solüsyon şeklinde kullanıldı.

DAB (3, 3 diaminobenzidin) Kromojen:

Bu madde ikincil antikor olarak kullanılan Horseradish-peroksidaz enziminin substratı olarak kullanıldı. Üretici firmanın (Scytek, Utah, Amerika Birleşik Devletleri) önerisine göre 125 ml substrat için 7,5 ml kromojen içerecek şekilde karıştırıldı. Her karışım kullanımından yaklaşık 20 dk önce taze olarak hazırlandı.

Zıt Boyama:

Zıt boyamada amaç dokudaki antijenik olmayan hücre ve hücre yapılarını boyamaktır. Zıt boyama için Hematoksilen kullanıldı.

İmmünohistokimyasal Boyama Prosedürü

Sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı.

1. 2-3 µm kalınlığında elde edilen parafin kesitler etüvde 60 °C’de 1 saat bekletildi.
2. Deparafinizasyon işlemi için Ksilol-1’de 10 dk, Ksilol-2’de 10 dk bekletildi.
3. Dehidratasyon işlemi için sırasıyla,
 - a. %100’lük alkolde 5 dk bekletildi.
 - b. %96’lık alkolde 5 dk bekletildi.
 - c. %90’lık alkolde 5 dk bekletildi.
 - d. %80’lik alkolde 5 dk bekletildi.
 - e. %70’lik alkolde 5 dk bekletildi.
4. İki ayrı PBS solüsyonunda 5’er dk bekletildi.
5. Antijen retrieval uygulaması için sitrat buffer tamponu içinde mikrodalga fırında 600W’da 2 dk ısıtıldı ve 20 dk +4°C’de soğumaya bırakıldı.
6. Üç ayrı PBS solüsyonunda 3’er dk bekletildi.
7. PAP Pen kalem ile polilizinli lamaların üzerindeki doku kesitlerinin etrafı çizildi. Bu işlem ileriki safhalarda da gerektikçe tekrarlandı.
8. Dokuların üzerini kaplayacak şekilde ve diğer dokularla karışmamasına dikkat edilerek nemli ortamda %3’lük H₂O₂ solüsyonu damlatıldı. 10 dk oda sıcaklığında bekletildi.
9. Üç ayrı PBS solüsyonunda 3’er dk bekletildi.
10. Dokunun üzerini kapatacak şekilde Super Block damlatılarak 5 dk bekletildi.
11. Lamlardaki 1. kesitlere anti-RUNX2 primer ab, 2. kesitlere anti-Cathepsin K primer ab, 3. kesitlere kontrol amacıyla sekonder antikor damlatıldı. Lamlar nemli kabin içerisinde +4°C’de bir gece bekletildi.

12. Ertesi gün kesitler üç ayrı PBS solüsyonunda 3'er dk bekletildi.
13. Sekonder antikor (SensiTek Anti-Polyvalent Biotinylated Antibody), dokuların üzerini kaplayacak şekilde damlatılarak 20 dk bekletildi.
14. Üç ayrı PBS solüsyonunda 3'er dk bekletildi.
15. Dokunun üzerini tamamen kaplayacak şekilde Streptavidin Horseradish Peroksidaz (SensiTek HRP) damlatıldı ve 20 dk bekletildi.
16. Üç ayrı PBS solüsyonunda 3'er dk bekletildi.
17. DAB Kromojen solüsyonu, dokuların üzerine damlatıldı ve reaksiyon vermesi için 10 dk bekletildi.
18. Üç ayrı PBS solüsyonunda 3'er dk bekletildi.
19. Hematoksilen dokuların üzerini kaplayacak şekilde damlatılarak 30 sn bekletildi.
20. Çeşme suyunda 5 dk yıkandı.
21. Sırasıyla %70, %80, %90 ve %100'lük alkol serilerinden batır çıkar yapılarak geçirildi.
22. Kesitler şeffaflaşana kadar ksilolde bekletildi.
23. Entellan kullanılarak kapama yapıldı.

Boyanan örnekler binoküler mikroskopta incelenip değerlendirildi ve görüntüleme donanımı ile fotoğraflar elde edildi.

3.5. İstatistiksel Analiz

Çalışma verilerinin istatistiksel değerlendirmesi IBM SPSS 22.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, ABD) ile yapıldı.

Mikro bilgisayarlı tomografi ile yapılan yoğunluk ve hacim ölçümüne ait değişkenlere ilişkin tanımlayıcı istatistiksel ölçüt olarak aritmetik ortalama (Ort) $\pm$ standart sapma (SS) ve median (M), minimum (Min), maksimum (Maks) kullanıldı.

Değişkenlere ilişkin verilerin normal dağılım gösterip göstermediği Shapiro Wilk testi ile test edildi. Testin sonucuna göre; Kruskal-Wallis Varyans Analizi kullanıldı. $p<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Histokimyasal ve immunohistokimyasal analizlerin sonucu elde edilen verilerin tanımlanması ise median (min-max) ile yapıldı.

Osteoblast varlığı, fibröz bağ doku varlığı, hasarlı bölgenin asıl kemik dokuya tam implantasyonu ve osteoklastların varlığı yönünden grupların karşılaştırılması Kruskal-Wallis Varyans Analizi ile yapıldı. Gruplardaki ikili karşılaştırmada ise Conover testi kullanıldı. $p<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Mikro Bilgisayarlı Tomografi Bulguları

Kontrol grubu ile deney grupları arasındaki kıyaslama, oluşan yeni kemiğin hacim ve yoğunluğu dikkate alınarak yapılmıştır.

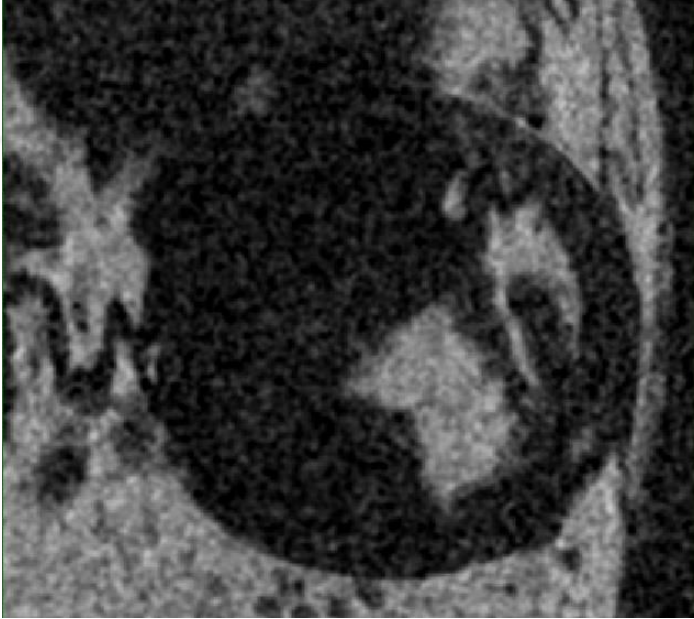
Oluşturulan defekt bölgesinde yeniden oluşan kemiğin hacim değerleri karşılaştırmalı olarak incelendi. Her üç grup da hacim değerleri açısından karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0.317$) (Tablo 4.1.), (Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3).



Şekil 4.1. Kontrol grubuna ait bir ham görüntü örneği



Şekil 4.2. Metformin grubuna ait bir ham görüntü örneği



Şekil 4.3. Exenatide grubuna ait bir ham görüntü örneği

Tablo 4.1. Yeni oluşan kemiklerin mm³ cinsinden hacim değerlerinin gruplara göre karşılaştırılması

Grup	Ort.	±SS	M	Min	Maks	p
Kontrol	0.52	±0.49	0.47	0.05	1.69	
Metformin	1.37	±1.56	0.58	0.17	4.48	
Exenatide	0.76	±0.38	0.70	0.19	1.40	
						0.317

Oluşturulan defekt bölgesinde yeniden oluşan kemiğin yoğunluk değerleri karşılaştırmalı olarak incelendi. Her üç grup da yoğunluk değerleri açısından karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (p=0.496) (Tablo 4.2.).

Tablo 4.2. Yeni oluşan kemiklerin gr/cm³ cinsinden yoğunluk değerlerinin gruplara göre karşılaştırılması

Grup	Ort.	±SS	M	Min	Maks	p
Kontrol	26.5	±7.5	26.99	16.54	42.30	
Metformin	42.04	±28.61	28.23	19.95	92.21	
Exenatide	26.44	±7.8	24.82	17.9	36.34	
						0.496

4.2. Histokimyasal Bulgular

Kontrol grubu ile deney grupları arasındaki kıyaslama; yeni kemik yapım alanları (osteoblastik aktivite), hasarlı bölgenin komşu durumdaki sağlam kemik doku ile arasındaki bileşim ve osteoklastik aktivite dikkate alınarak yapılmıştır.

Her üç grubun doku örneklerinden kesit alındığında kesitlerde hasarlı kısım; genellikle içi boş ve sağlam kemiğe tam olarak kaynamadığından doku bütünlüğü tam sağlanmamış şeklindeydi. Gruplarda hasarın olduğu kemik doku bölgesinin sınır kısmında; lamelsiz spiküler tarzda primer kemik doku oluşumları (olgunlaşmamış), osteoblastlar, yer yer osteoklastlar, yoğun fibröz bağ dokusu ve yağ hücreleri gözlemlenmiştir.

Gruplar karşılaştırıldığında tüm gruplarda fibröz bağ dokusu oluşumuyla beraber hasarlı kısım sağlam kemik dokusuna tam kaynamadığından kapanmanın olmadığı gözlemlenmiştir. Bu durum doku örneklerinden kesit alınınca tam bir doku bütünlüğü sağlanamadığından, hasarlı kısmın genelde içi boş şekilde gelmesiyle gözlemlenmiştir. Yeni kemik oluşumlarının hasarlı bölgenin çevresinde kompakt kemiğe doğru başlamış olduğu gözlenmiştir.

Deneysel parametrelerin histolojik (yapısal) değerlendirmesi aşağıdaki gibi skorlanmıştır:

- (negatif skor): Hiçbir yapısal değişikliğin olmaması,
- + (1 pozitif skor): Hafif derecede,
- ++ (2 pozitif skor): Orta derecede,
- +++ (3 pozitif skor): Ciddi derecede yapısal değişikliği ifade etmektedir.

Oluşturulan defekt bölgesinde görülen osteoblast, fibröz bağ doku, osteoklast varlığı ve hasarlı bölgenin sağlam kemik dokuya tam implantasyonu karşılaştırmalı olarak incelendi. Gruplar arasında fibröz bağ doku varlığı ($p=0.072$) ve hasarlı bölgenin

sağlam kemik dokuya tam implantasyonu ($p=0.386$) açısından anlamlı fark bulunmamıştır (Tablo 4.3.).

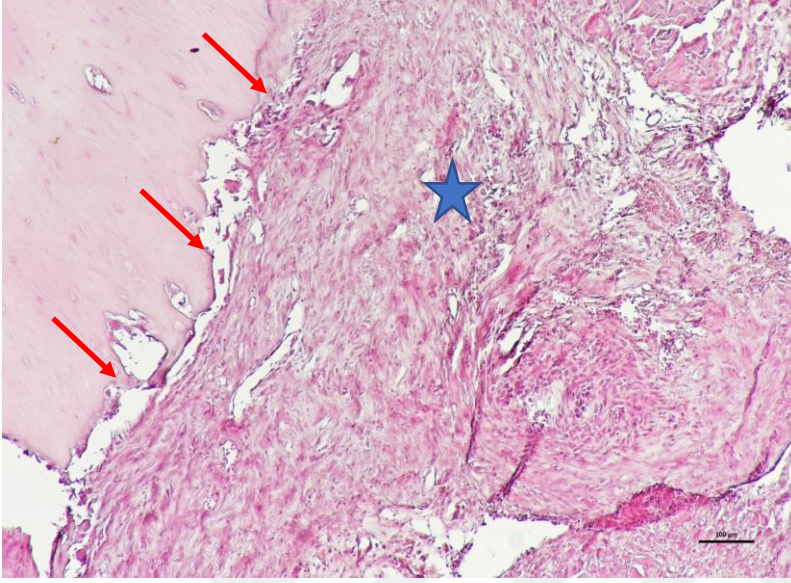
Osteoblast ($p=0.007$) ve osteoklast ($p=0.007$) hücrelerinin varlığı açısından karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur. Her iki değişkende metformin ve exenatide gruplarının, kontrol grubuna göre farklılık oluşturduğu ($p<0.05$), metformin ve exenatide grupları arasında farklılığın olmadığı ($p>0.05$) saptanmıştır (Tablo 4.3.).

Tablo 4.3. Yeni oluşan kemiklerde osteoblast, fibröz bağ doku, osteoklast varlığı ve hasarlı bölgenin sağlam kemik dokuya tam implantasyonunun gruplara göre karşılaştırılması

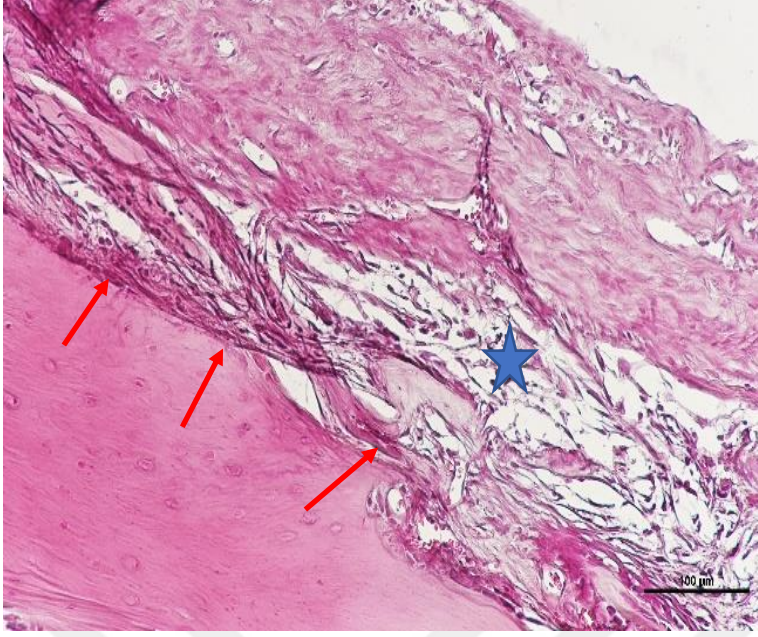
	Kontrol median (min-max)	Metformin median (min-max)	Exenatide median (min-max)	p
Osteoblast	1 (0-3)	3 (2-3)	2 (1-3)	0.007
Fibröz Bağ Doku	1 (0-3)	3 (1-3)	2 (1-3)	0.072
Osteoklast	1 (0-3)	3 (2-3)	2 (1-3)	0.007
Hasarlı Bölgenin Sağlam Kemik Dokuya Tam İmplantasyonu	0 (0-3)	1 (0-3)	1 (0-3)	0.386

Kemik yapımı bakımından gruplar karşılaştırıldığında en az kemik yapımının ilaç uygulanmayan kontrol grubunda olduğu görülmüştür ($p=0.007$) (Şekil 4.4, Şekil 4.5). Gruplar arasında kemik oluşumunun ve iyileşmenin en iyi metformin verilen

grupta olduğu gözlemlenirken (Şekil 4.6, Şekil 4.7), exenatide verilen grupta da kısmen de olsa kontrol grubuna kıyasla fazla oranda kemik oluşumu ve iyileşme gözlemlenmiştir (Şekil 4.8, Şekil 4.9).



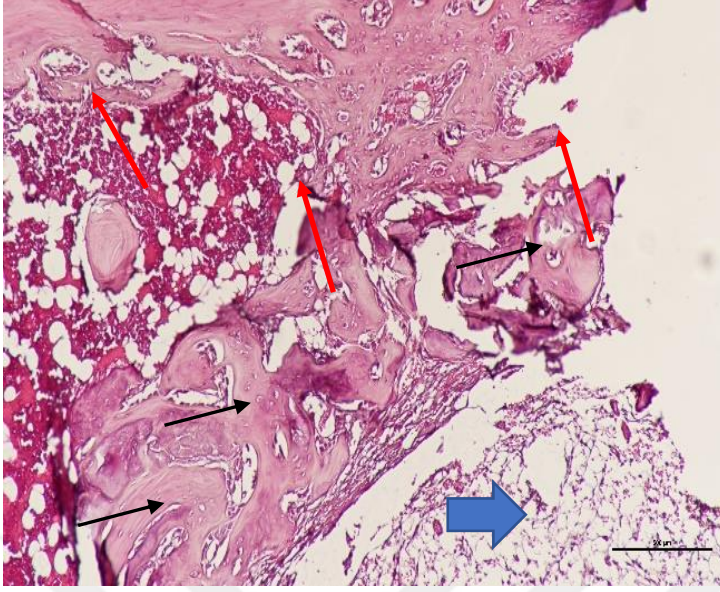
Şekil 4.4. Kontrol grubuna ait hematoksilin – eozin ile boyanmış doku örneği. Kırmızı oklar; komşu-sağlam kemik bölgesine ait sınır bölgesi, mavi yıldız; fibröz bağ dokusu (10x büyütme).



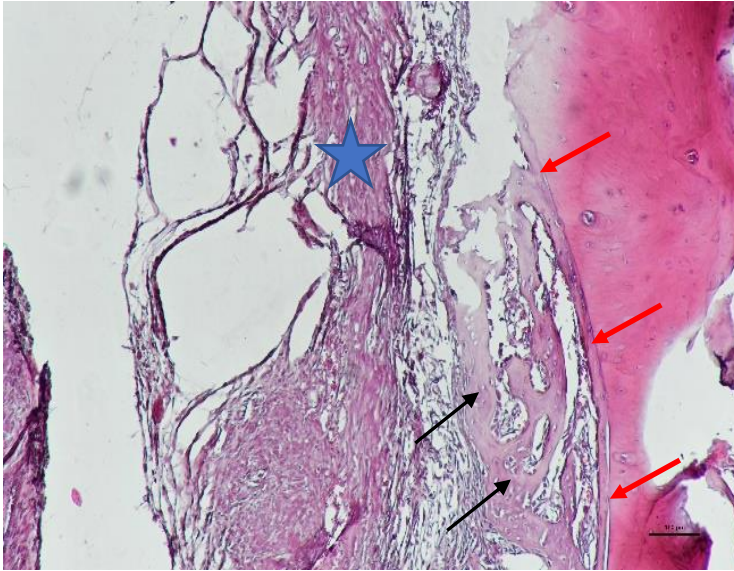
Şekil 4.5. Kontrol grubuna ait hematoksilen – eozin ile boyanmış doku örneği. Kırmızı oklar; komşu-sağlam kemik bölgesine ait sınır bölgesi, mavi yıldız; fibröz bağ dokusu (20x büyütme).



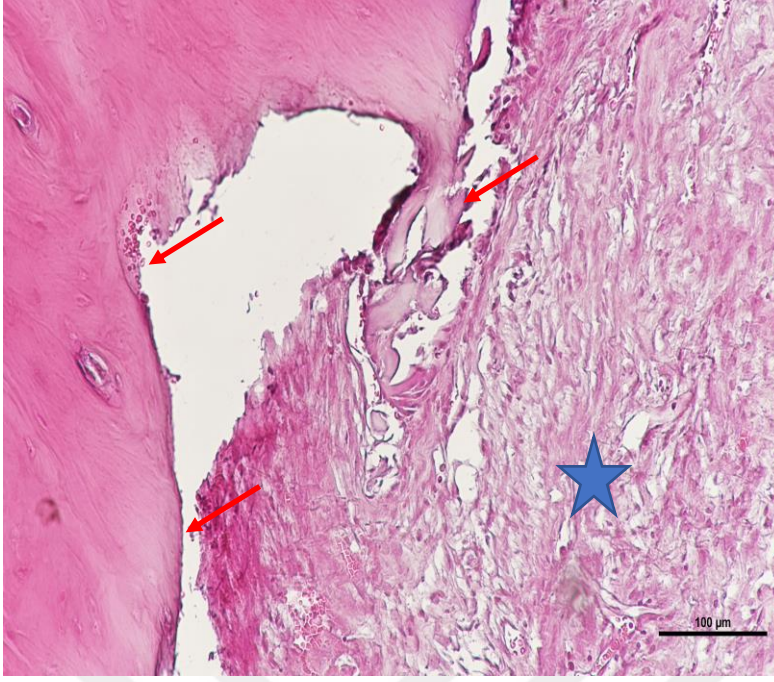
Şekil 4.6. Metformin verilen grubuna ait hematoksilen – eozin ile boyanmış doku örnekleri. Kırmızı oklar; komşu-sağlam kemik bölgesine ait sınır bölgesi, mavi yıldız; fibröz bağ dokusu, siyah oklar; yeni kemik alanları (10x büyütme).



Şekil 4.7. Metformin verilen grubuna ait hematoksilin – eozin ile boyanmış doku örnekleri. Kırmızı oklar; komşu-sağlam kemik bölgesine ait sınır bölgesi, mavi ok; yağ hücreleri, siyah oklar; yeni kemik alanları (20x büyütme).



Şekil 4.8. Exenatide verilen grubuna ait hematoksilin – eozin ile boyanmış doku örnekleri. Kırmızı oklar; komşu-sağlam kemik bölgesine ait sınır bölgesi, mavi yıldız; fibröz bağ dokusu, siyah oklar; yeni kemik alanları (10x büyütme).



Şekil 4.9. Exenatide verilen grubuna ait hematoksilin – eozin ile boyanmış doku örnekleri. Kırmızı oklar; komşu-sağlam kemik bölgesine ait sınır bölgesi, mavi yıldız; fibröz bağ dokusu (20x büyütme).

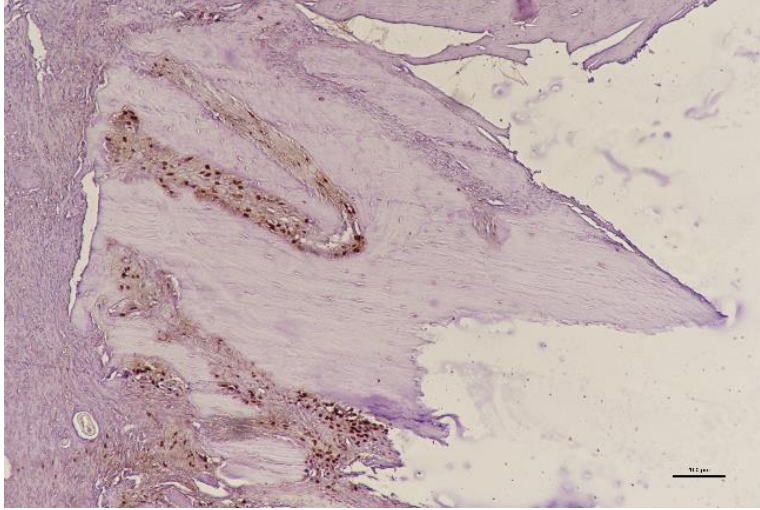
4.3. İmmünohistokimyasal Bulgular

RUN X: Osteoblastları işaretler, çekirdek boyaması gözlenir.

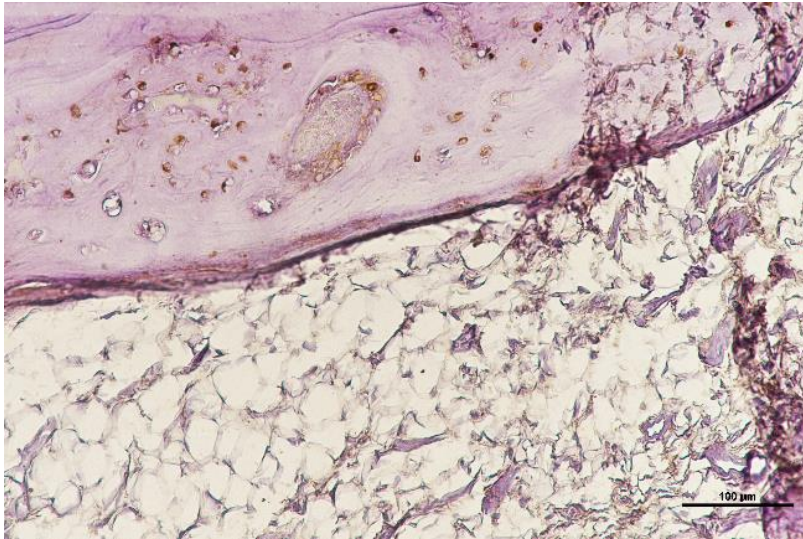
Catepsin K: Osteoklastları işaretler, sitoplazmik boyanma gözlenir.

Yeni kemik oluşumunda yıkım oranına eşit ya da daha fazla yapım olduğu için, RUN X ile boyanmalara yakın oranda Catepsin K ile boyanmalar gözlemlenmiştir.

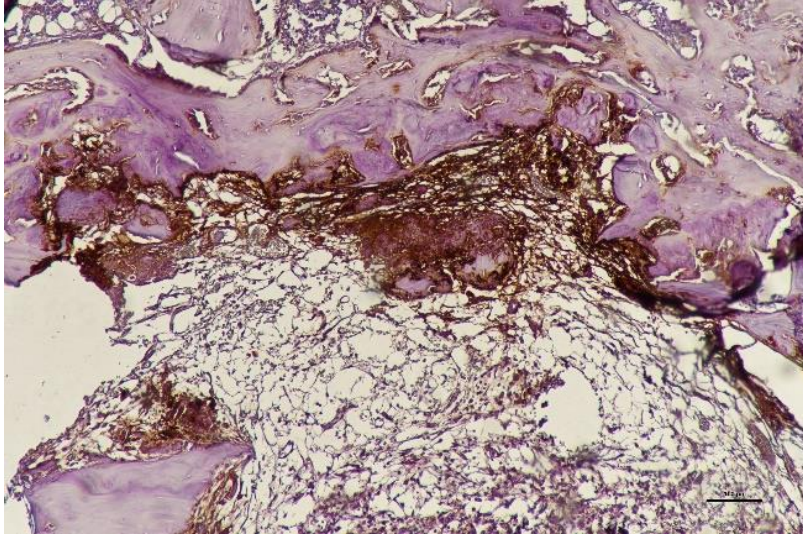
Gruplar kıyaslandığında en az RUN X pozitif (+) boyamanın ilaç uygulanmayan kontrol grubunda olduğu görülmüştür ($p=0.007$) (Şekil 4.10, Şekil 4.11). Gruplar arasında RUN X pozitif (+) boyamanın metformin verilen grupta (Şekil 4.12, Şekil 4.13) ve exenatide verilen grupta (Şekil 4.14, Şekil 4.15), kontrol grubuna kıyasla fazla olduğu gözlemlenmiştir ($p=0.007$).



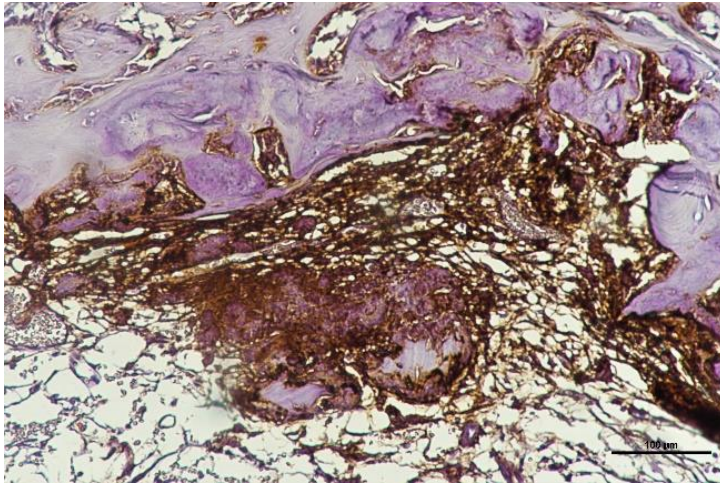
Şekil 4.10. Kontrol grubuna ait RUNX ile boyanmış doku örnekleri. Kahverengi kısımlar pozitif (+) boyanmaları gösterir (10x büyütme).



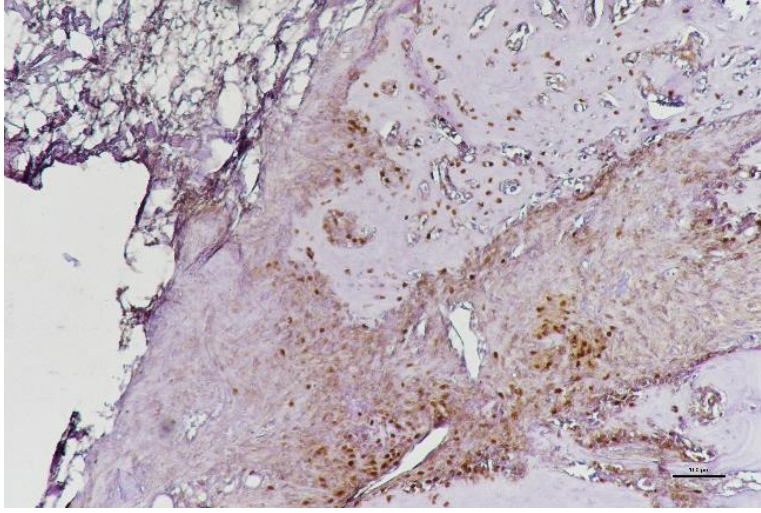
Şekil 4.11. Kontrol grubuna ait RUNX ile boyanmış doku örnekleri. Kahverengi kısımlar pozitif (+) boyanmaları gösterir (20x büyütme).



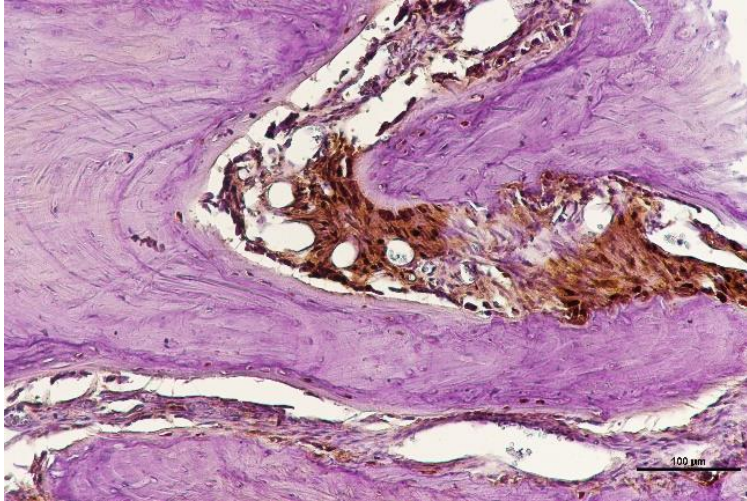
Şekil 4.12. Metformin grubuna ait RUNX ile boyanmış doku örnekleri.
Kahverengi kısımlar pozitif (+) boyanmaları gösterir (10x büyütme).



Şekil 4.13. Metformin grubuna ait RUNX ile boyanmış doku örnekleri.
Kahverengi kısımlar pozitif (+) boyanmaları gösterir (20x büyütme).

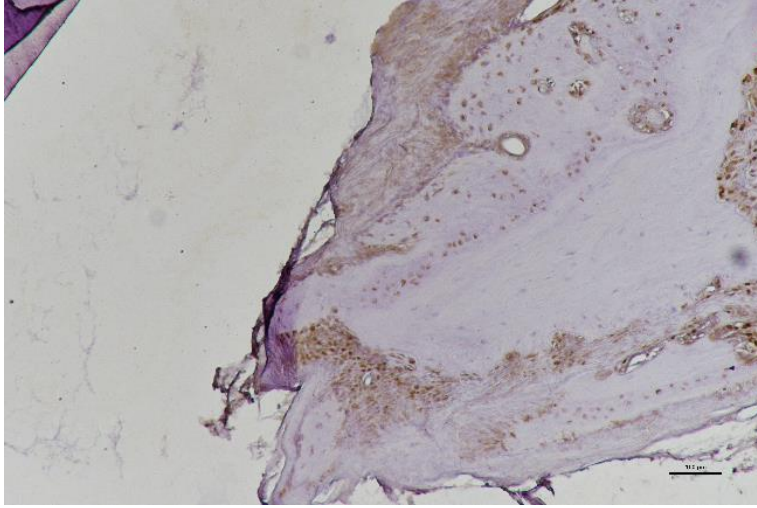


Şekil 4.14. Exenatide grubuna ait RUNX ile boyanmış doku örnekleri. Kahverengi kısımlar pozitif (+) boyanmaları gösterir (10x büyütme).

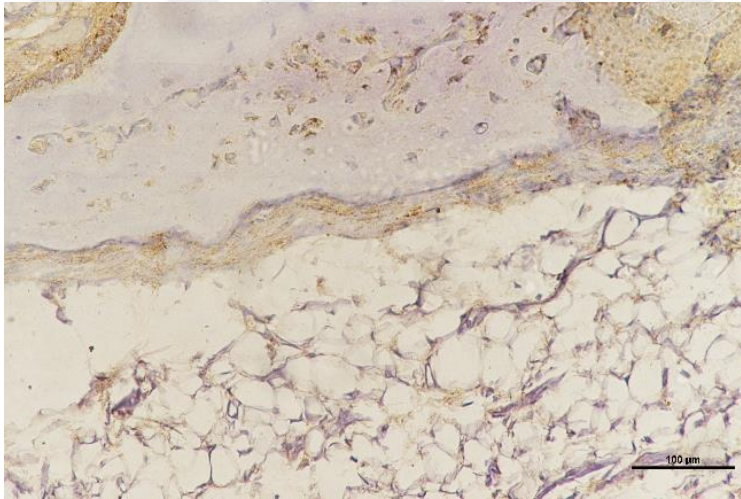


Şekil 4.15. Exenatide grubuna ait RUNX ile boyanmış doku örnekleri. Kahverengi kısımlar pozitif (+) boyanmaları gösterir (20x büyütme).

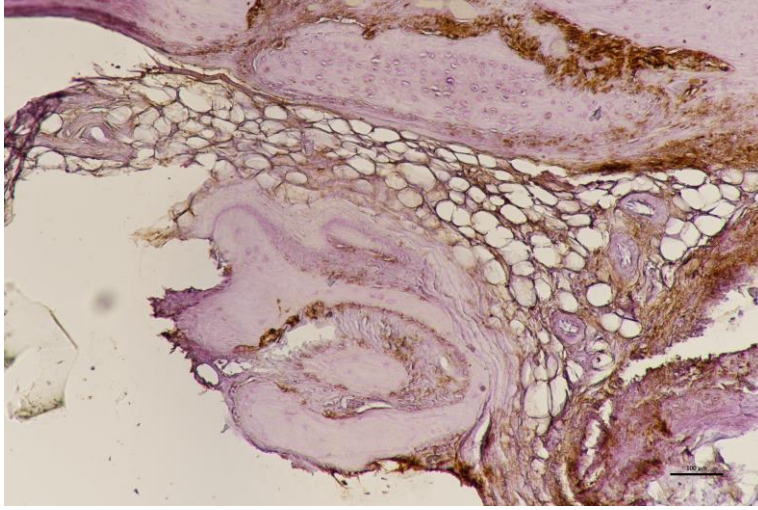
Gruplar kıyaslandığında en az Catepsin K pozitif (+) boyamanın ilaç uygulanmayan kontrol grubunda olduğu görülmüştür ($p=0.007$) (Şekil 4.16, Şekil 4.17). Gruplar arasında Catepsin K pozitif (+) boyamanın metformin verilen grupta (Şekil 4.18, Şekil 4.19) ve exenatide verilen grupta (Şekil 4.20, Şekil 4.21), kontrol grubuna kıyasla fazla olduğu gözlemlenmiştir ($p=0.007$).



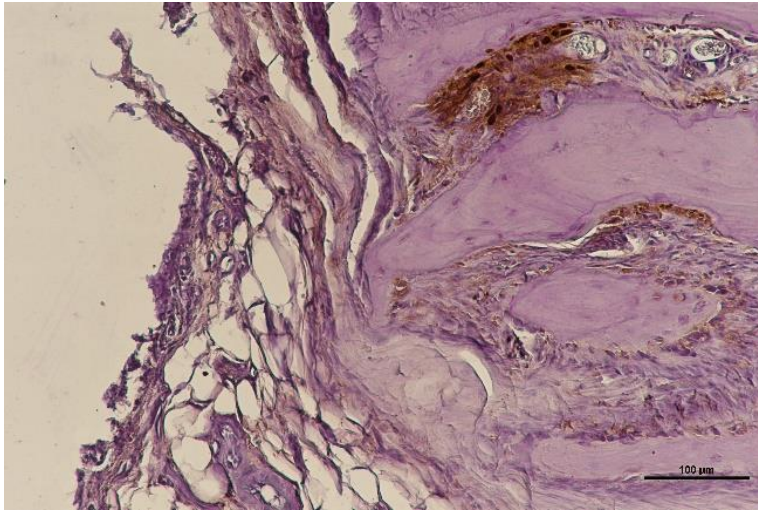
Şekil 4.16. Kontrol grubuna ait Cathepsin K ile boyanmış doku örnekleri.
Kahverengi kısımlar pozitif (+) boyanmaları gösterir (10x büyütme).



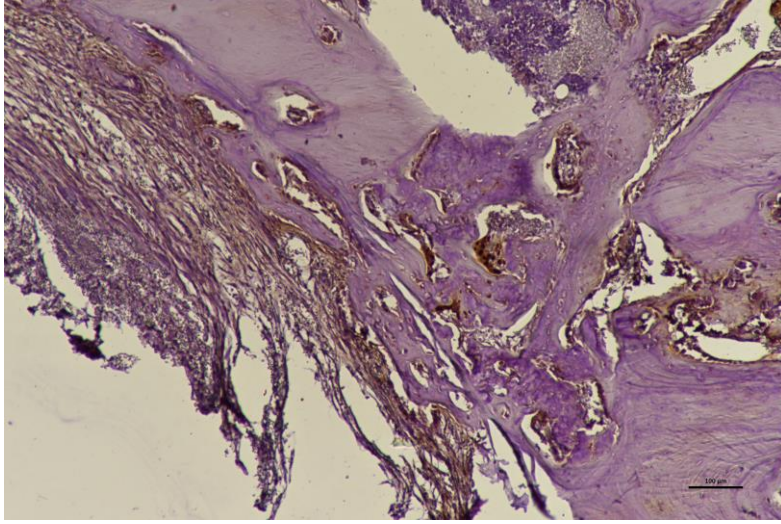
Şekil 4.17. Kontrol grubuna ait Cathepsin K ile boyanmış doku örnekleri.
Kahverengi kısımlar pozitif (+) boyanmaları gösterir (20x büyütme).



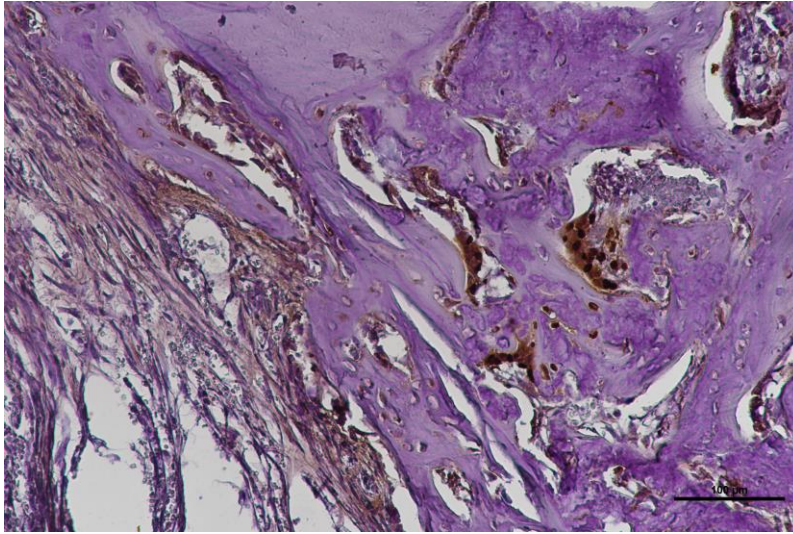
Şekil 4.18. Metformin grubuna ait Catepsin K ile boyanmış doku örnekleri.
Kahverengi kısımlar pozitif (+) boyanmaları gösterir (10x büyütme).



Şekil 4.19. Metformin grubuna ait Catepsin K ile boyanmış doku örnekleri.
Kahverengi kısımlar pozitif (+) boyanmaları gösterir (20x büyütme).



Şekil 4.20. Exenatide grubuna ait Cathepsin K ile boyanmış doku örnekleri.
Kahverengi kısımlar pozitif (+) boyanmaları gösterir (10x büyütme).



Şekil 4.21. Exenatide grubuna ait Cathepsin K ile boyanmış doku örnekleri.
Kahverengi kısımlar pozitif (+) boyanmaları gösterir (20x büyütme).

5. TARTIŞMA

Yapılan literatür taramasında metformin ve exenatide ilaçlarının bir kemik defekti üzerindeki etkilerini değerlendiren bir klinik çalışma bulunmadığı ve daha fazla prelinik çalışmaya ihtiyaç duyulduğu görülmüştür. Çalışmamızda hem uygun doku, boyut ve anatomiye sahip olması nedeniyle hem de filogenetik skaladaki sıralamasının düşük olması nedeniyle rat türü kullanılması tercih edilmiştir. Bununla birlikte rat türünün kemik metabolizması çok hızlıdır ve bu da çalışmamızın sınırlamalarından birini oluşturmaktadır.

Ülkemizde metformin ilacı sadece tablet formunda bulunurken, exenatide ilacı sadece enjeksiyon formunda bulunmaktadır. Bu iki ilacın etkilerinin daha sağlıklı karşılaştırılabilmesi için metformin ilacı intraoral gavaj yoluyla, exenatide ilacı ise intraperitoneal yolla verilmiştir. Fakat exenatide ilacının normal kullanımı subkütan şeklindedir. Exenatide ilacının etkisi bu kullanım yolu farklılığı nedeniyle olması gerekenden daha düşük çıkmış olabilir. Bununla birlikte intraperitoneal yolla verilen ilaç direkt olarak sirkülasyona dahil olurken, intraoral yolla verilen ilaç sirkülasyona katılmadan önce mideden absorbe olmaktadır. Buna bağlı olarak da intraperitoneal yolla verilen ilacın biyoyararlanımı daha yüksektir. Bu da metformin ilacının etkilerinin exenatide ilacının etkilerine kıyaslanmasında göz önünde bulundurulmalıdır.

Apikal periodontitis, endodontik kökenli etiyolojik ajanların neden olduğu periradiküler bir doku bozukluğudur. Bu durum periradiküler sert dokuların rezorpsiyonu ile birlikte periodontal ligamentin yıkımı ve kronik lezyon oluşumu ile sonuçlanabilir (50). Buna genel olarak apikal kök kanalında bulunan veya periapikal dokularda bulunan mikroorganizmalar neden olur. Fakat travma gibi fiziksel ya da diğer kimyasal irritasyonlar sonucunda da enflamasyon görülebilir. Bu sürece spontan ağrılar, dişte yükselme hissi ve perküsyona duyarlılık eşlik edebilir ve bu ilk semptomatik lezyonlar akut apikal periodontitis olarak görülür. Sonuç olarak aseptik ve enfeksiyöz

enflamasyonlar arasında net bir ayrım olmadığı belirtilmelidir. Doku tepkisi genellikle hiperemi, damar tıkanıklığı, periodontal ligamentte ödem ve nötrofillerin ekstrasvazasyonu ile sonuçlanan enflamasyonun tipik nörovasküler tepkisi ile başlar (15). Çalışmamızda oluşturduğumuz defektler steril olarak hazırlanmış ve yara bölgesi primer olarak kapatılmıştır. Buna bağlı olarak henüz enfekte olmayan bir apikal periodontitis modeli taklit edilmiştir.

Diabetes mellitus, apikal periodontitis ile olası bir ilişkisi olan sistemik bir hastalıktır (108, 109). Diabetes mellitus, pankreas β -hücrelerinin işlev bozukluğuna bağlı olarak, insülin sekresyonunda ve/veya periferik insülin direnci gösteren ve ana özellik olarak hiperglisemiye neden olan metabolik bir hastalıktır (110, 111). Diabetes mellitus varlığında lökositlerin fonksiyonu; proinflamatuar sitokinlerin salınımının artması ve makrofaj büyüme faktörlerinin salgılanmasının azalması, kronik enflamatuar süreçlerin gelişmesini kolaylaştırmak ve doku onarım yeteneğini azaltmak ile değiştirilir (112). Son zamanlarda yapılan bir meta-analiz diyabet ile diyabetik hastalarda gecikmiş periapikal onarımı gösteren çalışmalarla uyumlu olarak, apikal periodontitisin radyolojik bulguları ile kök dolgulu dişlerin sıklığı arasında anlamlı bir ilişki olduğunu göstermiştir (113).

Genel olarak, diyabet hastaları diyabetik olmayanlara kıyasla daha düşük kemik kalitesine sahiptir ve diyabetin kemik dokusunu (osteopeni ve osteoporoz) etkileyebileceği bildirilmiştir. Diyabet; glukoz metabolizması bozukluğu, kemik mikrovasküler fonksiyonunun bozulması, glukoz oksidatif türevleri ve kas endokrin fonksiyonuyla kemikleri etkiler (114). Jeyabalan (115) ve arkadaşları sağlıklı ratlarla yaptığı çalışmada metforminin trabeküler kemik hacminin artışında anlamlı bir fark oluşturmadığı mikro bilgisayarlı tomografi kullanarak yaptığı ölçümlerle bulmuştur. Zhao ve ark. (116) glukokortikosteroid ile osteoporoz oluşturdukları bir hayvan

deneyinde, metforminin trabeküler kemik hacminde artışa neden olduğunu fakat kortikal kemikte herhangi bir etki göstermediğini bulmuştur. Lai ve ark. (117) ratların mandibular kemiklerinde oluşturduğu periapikal lezyonların iyileşmesi için lokal metformin uygulamış ve 4 haftanın sonunda metforminin lezyon hacmini küçülttüğünü bildirmiştir. Kortikal kemiğin yeniden şekillenme zamanı trabeküler kemiğe göre daha uzundur (118). Çalışmamız oluşturulan defekt bölgelerindeki kemik hacmi ve yoğunluğunun mikro bilgisayarlı tomografi ile incelendiği ilk çalışmadır. Bulgularımız metforminin kemik hacmi ($p=0.317$) ve kemik yoğunluğu ($p=0.496$) açısından anlamlı bir fark oluşturmadığını göstermektedir. Bunun nedeni çalışmamızın süresinin görece kısa olması (10 gün) ve defektlerin kortikal kemikte oluşturulması olabilir.

Meng ve ark. (119) halihazırda kemik kaybı görülen farelerde, exendin-4'ün örneklerin femur ve vertebralarında kemik hacmi ve yoğunluğunu arttırdığını mikro bilgisayarlı tomografi kullanarak yaptıkları ölçümlerle bulmuşlardır. Ma ve ark. (120) da ovariectomize ratların femur ve vertebraları ile yaptıkları çalışmada exendin-4'ün kemik hacmi ve yoğunluğunu arttırdığını mikro bilgisayarlı tomografi kullanarak yaptıkları ölçümlerle bulmuşlardır. Pereira ve ark. (90, 121) farelerin tibialarında yaptıkları farklı çalışmalarda exendin-4'ün ve exenatidin trabeküler kemik hacmini arttırdığını fakat kortikal kemik hacmi üzerine bir etkisi olmadığını bildirmişlerdir. Nuche-Berenguer ve ark. (122) ise exendin-4'ün kemik hacmi ve yoğunluğuna herhangi bir etkisi olmadığını bildirmiştir. Çalışmamızda exenatidin kemik hacmi/yoğunluğu açısından anlamlı bir fark oluşturmadığı bulunmuştur. Çalışmamızda oluşturduğumuz defektler kortikal kemikte oluşturulmuştur. Bulgularımız exenatidin kortikal kemikte hacim ($p=0.317$) ve yoğunluk ($p=0.496$) üzerine etkisi olmadığını belirten diğer çalışmalarla uyumludur (90, 121, 122). Bunun nedeni de çalışmamızın süresinin görece kısa olması (10 gün) ve defektlerin kortikal kemikte oluşturulması olabilir.

Diyabetik hastalarda glikasyon son ürün seviyeleri yükselmekte, doku oksidatif stresini ve inflamatuvar tepkileri arttırmaktadır (123). Bazı in vitro çalışmalarda, glikasyon son ürünlerinin osteoblastik proliferasyon (124) ve osteoklastik rezorbsiyon (125) üzerinde uyarıcı etkilere sahip olduğu öne sürülmüştür. Cortizo ve ark. (85) hücre kültüründe yaptığı bir çalışmada metforminin osteoblast hücrelerinin proliferasyonunu, farklılaşmasını ve mineralizasyonunu arttırdığını bulmuşlardır. Molinuevo ve ark. (86) diyabetik olmayan ratların parietal kemiklerinde benzer defekt oluşturarak yaptıkları çalışmada metforminin kemik reossifikasyonunda artışa sebep olduğunu bildirmişlerdir. Her iki çalışmada da metforminin kemik hücreleri üzerinde doğrudan etkiler uygulayarak osteoprogenitör hücrelerin osteoblastik fenotip ve kemik oluşumuna bağlılığını tetikleyebileceğini gösterilmektedir (85, 86). Çalışmamızın bulguları da metforminin osteoblast sayısını kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığını göstermektedir ($p=0.007$). Kanazawa ve ark. (5) hücre kültüründe yaptığı çalışmada metforminin osteoblastik hücrelerin AMPK aktivasyonu yoluyla farklılaşmasını ve mineralleşmesini arttırdığını bulurken, Kasai ve ark. (126) ise hücre kültüründe yaptığı çalışmada metforminin AMPK sinyalizasyonunu inhibe ederek osteoblastik aktiviteyi olumsuz etkilediği belirtmiştir. Bu durum kullanılan metformin dozunun ve değerlendirmede kullanılan yöntemlerin farklılığı ile açıklanabilir.

Pereira ve ark. (121) diyabetik fareler üzerinde yaptıkları çalışmada exenatidin osteoblast sayıları üzerine düşük glikoz ortamında etkisinin olmadığını fakat yüksek glikoz içeren ortamda osteoblast sayısını arttırdığını bulmuşlardır. Ma ve ark. (120) ovariektomize ratlarda yaptığı çalışmada GLP-1 reseptör agonisti exendin-4'ün osteoblastik aktiviteyi arttırdığını bulmuştur. Meng ve ark. (119) yaptıkları çalışmada exendin-4'ün osteoblastik aktiviteyi arttırdığını bulmuştur. Mansur ve ark. (127) yüksek yağlı beslenen diyabetik ratlarda yaptığı çalışmada exenatidin osteoblast sayısını

arttırdığını bildirmiştir. Çalışmamızda sentetik exendin-4 olan exenatide kullanılmıştır. Bilgilerimiz dâhilinde, çalışmamız exenatidin osteoblastik etkisinin bir defekt oluşturularak incelendiği ilk çalışmadır. Bununla birlikte exenatidin osteoblast sayısını kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde arttırdığı bulunmuştur ($p=0.007$) ve bulgularımız diğer çalışmalarla uyumludur (119, 120).

Metforminin osteoklastlar üzerine etkisini araştıran çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bak ve ark. (128) yaptığı bir çalışmada metforminin, osteoklast oluşumu üzerinde hiçbir etkisi olmadığını bildirmiştir. Bununla birlikte Gao ve ark. (129) metforminin, RANKL ile indüklenen osteoklastların in vitro differasyonunu önlediğini göstermiştir. Ayrıca, Mai ve ark. (130) ovariektomize sıçanlarda oral metformin tedavisinin kemik üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Bu çalışmanın sonucunda, metforminin osteoprotegerin sentezini uyarıp, osteoblastlarda RANKL ekspresyonunu azaltarak OPG/RANKL oranının artmasına ve in vivo ve in vitro osteoklast differasyonunun azalmasına neden olduğunu belirtmiştir. Bu çalışmaların hiçbirinde kemiklerde bir defekt oluşturulmamıştır. Molinuevo ve ark. (86) ise diabetik olmayan ratların parietal kemiklerinde defekt oluşturarak yaptığı çalışmada, metforminin diyabetik olmayan hayvanlarda toplam osteoklastik aktiviteyi arttırdığını bulmuştur. Bizim çalışmamızın bulguları da metforminin osteoklast sayısını kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde arttırdığını göstermiştir ($p=0.007$) ve bu çalışmanın bulguları ile uyumludur (86). Osteoklastik kemik rezorpsiyonunun normal remodelizasyon döngüsünde osteoblastik kemik oluşumundan önce geldiği genel olarak kabul edilir (131). Kemğin hasar görmesinden sonra, hasarlı bölgenin yakınında bulunan osteositler ölür. Osteositlerin ölümü, etkilenen bölgedeki osteosite bağımlı kemik matrisinin tahrip olmasına neden olur. Ölü kemik dokusu osteoklastlar tarafından parçalanır, böylece osteoblastların yeni canlı kemiği oluşturması için yer yaratır (132). Osteoklastlar ise belirli bir bölgeye

alınmakta, kemiğe yapışmakta ve tekrar emilmektedir. Osteoblastlar, rezorbe edilmiş bölgeleri, bilinmeyen bir mekanizma ile tanır, bu bölgelere göç eder ve defekti osteoidin (kemik hücre dışı matrisi) salgılanmasıyla onarır. Böylece osteoklastik rezorpsiyon ve osteoblastik formasyon birleştirilir (131). Kemik rezorpsiyonu ve kemik oluşumunun yakın koordinasyonu *birleşme* olarak bilinir ve aynı zamanda temel çok hücreli bir birim olarak adlandırılır. Birleşme fizyolojik bir olaydan daha fazlasıdır. Osteoblastik soydaki hücrelerin osteoklast farklılaşmasını düzenlediği, düzenleyici bir etkileşim oluşur (131). Bu etkileşimi göstermek için osteoblastlar veya stromal hücreler biçimindeki osteoblast öncüleri, osteoklast öncüleri kaynağı olarak kemik iliği veya dalak hücreleri ile kültürlenmiş ve sonucunda fonksiyonel osteoklastların oluşumu görülmüştür (133, 134). Metforminin osteoklast sayısını kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde arttırdığını gösteren bulgularımız ($p=0.007$) muhtemelen osteoklastların osteoblastlarla lokal olarak birleştirilmesini içeren süreçte lezyon bölgesinde kemik oluşumunda ve yeniden yapılanmada bir artışı yansıtmaktadır (131, 132). Kemik iyileşme modelimizde, metforminin defekt bölgesindeki yeniden kemikleşme ve osteoklastik aktiviteyi eşzamanlı olarak arttırdığı, kemik oluşumunda ve yeniden yapılanmada uyumlu bir artış olduğunu ortaya koymuştur.

Yamada ve ark. (7) GLP-1'in, Mansur ve ark. (127) ve Pereira ve ark. (121) ise exenatidin osteoklast sayısı üzerine bir etkisi olmadığını bildirmiştir. Bununla birlikte Ma ve ark. (120) exendin-4'ün ovariektomizasyon sonrası osteoklastik aktiviteyi azalttığını bildirmiştir. Çalışmamızda exenatide, kontrol grubuna göre osteoklast sayısını anlamlı bir şekilde arttırmıştır ($p=0.007$). Bu bulgular da metformin bulgularımız gibi osteoklastların osteoblastlarla lokal olarak eşleşmesini içeren birleşme fenomeni ile açıklanabilir. Bulgularımız yine defekt bölgesinde kemik oluşumunda ve yeniden yapılanmada bir artışı yansıtır (131, 132).

Kontrol altında olmayan şeker hastaları lökosit fonksiyonunda ve yara iyileşmesinde daha fazla immünolojik değişikliklere sahiptir (112, 135, 136). Jeyabalan ve ark. (115) ratların femurlarında kırık oluşturarak yaptığı çalışmada 4 haftanın sonunda metforminin ratların kemiklerinde tam iyileşmeye bir katkısı olmadığını bildirmiştir. Çalışmamızda metforminin hasarlı bölgenin sağlam kemiğe tam implantasyonuna anlamlı bir etkisi olmadığı bulunmuş olup ($p=0.386$), bulgularımız Jeyabalan ve ark. (115) yaptığı çalışmayla uyumludur. Çalışmamızda kullanılan defektin iyileşmesi nispeten kısa bir sürede (10 gün) meydana gelir ve reossifikasyon işlemi intramembranözdür. Yani iyileşmesi endokondral kemik onarımında olduğu gibi yumuşak kallus oluşumunu içermez. Ancak, lezyonun sert bir primer kemik callusu ile doğrudan bir köprü oluşturmasını içerir. Bu köprü daha sonra osteoklast ve osteoblastların kombine etkisi ile olgun kemiğe yeniden dönüşür (86).

Çalışmamızda exenatidin hasarlı bölgenin sağlam kemiğe tam implantasyonuna anlamlı bir etkisi olmadığı bulunmuş olup ($p=0.386$), bu durum da exenatidin kortikal kemik üzerine etkisinin olmaması ve oluşturduğumuz defektlerin iyileşmesi için beklediğimiz sürenin (10 gün) az olmasıyla açıklanabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

İki farklı anti-diyabetik ilacın periapikal lezyon benzeri defektlerin iyileşmesine etkisinin değerlendirildiği bu hayvan deneyi çalışmasının sınırları dâhilinde şu sonuçlara varılmıştır:

- Exenatide ve metformin ilaçlarının sistemik yollarla verilmesi kemik iyileşmesinde hacim ve yoğunluk olarak kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmamıştır. Bununla birlikte metforminin, hacim ve yoğunluğu sayısal değer olarak daha fazla arttırdığı görülmüştür.
- Exenatide ve metformin ilaçları, oluşturulan defektlerde osteoblastik ve osteoklastik aktiviteyi arttırmıştır. Buna göre periapikal lezyonlara sahip diyabet hastalarında bu ilaçların düzenli kullanımı periapikal lezyonların iyileşmesine katkı sağlayacaktır.
- Bu çalışma ilaçların uygulanma şekli, uygulanma süresi gibi parametreleri değerlendirecek daha ileri çalışmalara rehber olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Stashenko P, Teles R, D'Souza R. Periapical inflammatory responses and their modulation. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998,9(4):498-521.
2. Sigurdsson A, Garland RW, Le KT, Rassoulia SA. Healing of Periapical Lesions after Endodontic Treatment with the GentleWave Procedure: A Prospective Multicenter Clinical Study. *J Endod* 2018,44(3):510-517.
3. Shuping GB, Ørstavik D, Sigurdsson A, Trope M. Reduction of Intracanal Bacteria Using Nickel-Titanium Rotary Instrumentation and Various Medications. *J Endod* 2000,26(12):751-755.
4. Qin W, Gao X, Ma T, Weir MD, Zou J, Song B, et al. Metformin Enhances the Differentiation of Dental Pulp Cells into Odontoblasts by Activating AMPK Signaling. *J Endod* 2018,44(4):576-584.
5. Kanazawa I, Yamaguchi T, Yano S, Yamauchi M, Sugimoto T. Metformin enhances the differentiation and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells via AMP kinase activation as well as eNOS and BMP-2 expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2008,375(3):414-419.
6. Eminov E, Hortu I, Akman L, Erbas O, Yavasoglu A, Cirpan T. Exenatide preserves trabecular bone microarchitecture in experimental ovariectomized rat model. *Arch Gynecol Obstet* 2018,297(6):1587-1593.
7. Yamada C, Yamada Y, Tsukiyama K, Yamada K, Udagawa N, Takahashi N, et al. The murine glucagon-like peptide-1 receptor is essential for control of bone resorption. *Endocrinology* 2008,149(2):574-579.
8. Lamari Y, Boissard C, Moukhtar MS, Jullienne A, Rosselin G, Garel JM. Expression of glucagon-like peptide 1 receptor in a murine C cell line: regulation of calcitonin gene by glucagon-like peptide 1. *FEBS Lett* 1996,393(2-3):248-252.

9. Nuche-Berenguer B, Portal-Nunez S, Moreno P, Gonzalez N, Acitores A, Lopez-Herradon A, et al. Presence of a functional receptor for GLP-1 in osteoblastic cells, independent of the cAMP-linked GLP-1 receptor. *J Cell Physiol* 2010,225(2):585-592.
10. Trowbridge HO. Immunological aspects of chronic inflammation and repair. *J Endod* 1990,16(2):54-61.
11. Gao Z, Mackenzie IC, Rittman BR, Korszun AK, Williams DM, Cruchley AT. Immunocytochemical examination of immune cells in periapical granulomata and odontogenic cysts. *J Oral Pathol* 1988,17(2):84-90.
12. Kaneko T, Okiji T, Kan L, Takagi M, Suda H. Ultrastructural analysis of MHC class II molecule-expressing cells in experimentally induced periapical lesions in the rat. *J Endod* 2001,27(5):337-342.
13. Stern MH, Dreizen S, Mackler BF, Levy BM. [Antibody-producing cells in human periapical granulomas and cysts]. *J Endod* 1981,7(10):447-452.
14. Kawashima N, Stashenko P. Expression of bone-resorptive and regulatory cytokines in murine periapical inflammation. *Arch Oral Biol* 1999,44(1):55-66.
15. Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004,15(6):348-381.
16. Bergenholtz G. Pathogenic mechanisms in pulpal disease. *J Endod* 1990,16(2):98-101.
17. Sjogren U, Hagglund B, Sundqvist G, Wing K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. *J Endod* 1990,16(10):498-504.
18. Ramachandran Nair PN. Non-microbial etiology: foreign body reaction maintaining post-treatment apical periodontitis. *Endodontic Topics* 2003,6(1):114-134.

19. Garcia CC, Sempere FV, Diago MP, Bowen EM. The post-endodontic periapical lesion: histologic and etiopathogenic aspects. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2007,12(8):E585-590.
20. Kvinnsland S, Kristiansen AB, Kvinnsland I, Heyeraas KJ. Effect of experimental traumatic occlusion on periodontal and pulpal blood flow. *Acta Odontol Scand* 1992,50(4):211-219.
21. Shi Y, Wang J, Cao C. [Clinical studies on pulpitis and periapical periodontitis caused by traumatic occlusion]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 1997,32(1):23-25.
22. Lutz F, Krejci I, Imfeld T, Elzer A. [The hydrodynamic behavior of dentinal tubule fluid under occlusal loading]. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 1991,101(1):24-30.
23. Caviedes-Bucheli J, Azuero-Holguin MM, Correa-Ortiz JA, Aguilar-Mora MV, Pedroza-Flores JD, Ulate E, et al. Effect of experimentally induced occlusal trauma on substance p expression in human dental pulp and periodontal ligament. *J Endod* 2011,37(5):627-630.
24. Caviedes-Bucheli J, Gomez-Sosa J, M Azuero-Holguin M, Ormeño-Gomez M, Pinto-Pascual V, Muñoz H. Angiogenic mechanisms of human dental pulp and their relationship with Substance P expression in response to occlusal trauma. *Int Endod J* 2016,50:n/a-n/a.
25. Yoshinaga Y, Ukai T, Abe Y, Hara Y. Expression of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand relates to inflammatory bone resorption, with or without occlusal trauma, in rats. *Journal of periodontal research* 2007,42:402-409.
26. Abbott PV. Classification, diagnosis and clinical manifestations of apical periodontitis. *Endodontic Topics* 2004,8(1):36-54.

27. Andreasen FM. Transient apical breakdown and its relation to color and sensibility changes after luxation injuries to teeth. *Endodontics & Dental Traumatology* 1986,2(1):9-19.
28. Andreasen J. Effect of excessive occlusal trauma upon periodontal healing after replantation of mature permanent incisors in monkeys. *Swedish dental journal* 1981,5:115-122.
29. He B, Hu M, Li SD, Yang XT, Lu YQ, Liu JX, et al. Effects of geraniin on osteoclastic bone resorption and matrix metalloproteinase-9 expression. *Bioorg Med Chem Lett* 2013,23(3):630-634.
30. Sato K, Suematsu A, Okamoto K, Yamaguchi A, Morishita Y, Kadono Y, et al. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *The Journal of Experimental Medicine* 2006,203(12):2673-2682.
31. Suzuki N, Takimoto K, Kawashima N. Cathepsin K Inhibitor Regulates Inflammation and Bone Destruction in Experimentally Induced Rat Periapical Lesions. *J Endod* 2015,41(9):1474-1479.
32. Zhou X, Zhang W, Liu X, Zhang W, Li Y. Interrelationship between diabetes and periodontitis: role of hyperlipidemia. *Arch Oral Biol* 2015,60(4):667-674.
33. Cho NH, Shaw JE, Karuranga S, Huang Y, da Rocha Fernandes JD, Ohlrogge AW, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract* 2018,138:271-281.
34. Efendic S, Ostenson CG. Hormonal responses and future treatment of non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM). *J Intern Med* 1993,234(2):127-138.
35. Lecka-Czernik B. Bone loss in diabetes: use of antidiabetic thiazolidinediones and secondary osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep* 2010,8(4):178-184.

36. Garber SE, Shabahang S, Escher AP, Torabinejad M. The effect of hyperglycemia on pulpal healing in rats. *J Endod* 2009,35(1):60-62.
37. Manfredi M, McCullough MJ, Vescovi P, Al-Kaarawi ZM, Porter SR. Update on diabetes mellitus and related oral diseases. *Oral Dis* 2004,10(4):187-200.
38. Lamster IB, Lalla E, Borgnakke WS, Taylor GW. The relationship between oral health and diabetes mellitus. *J Am Dent Assoc* 2008,139 Suppl:19S-24S.
39. Miley DD, Terezhalmay GT. The patient with diabetes mellitus: etiology, epidemiology, principles of medical management, oral disease burden, and principles of dental management. *Quintessence Int* 2005,36(10):779-795.
40. Bender IB, Bender AB. Diabetes mellitus and the dental pulp. *J Endod* 2003,29(6):383-389.
41. Leite MF, Ganzerla E, Marques MM, Nicolau J. Diabetes induces metabolic alterations in dental pulp. *J Endod* 2008,34(10):1211-1214.
42. Lalla RV, D'Ambrosio JA. Dental management considerations for the patient with diabetes mellitus. *J Am Dent Assoc* 2001,132(10):1425-1432.
43. Grossi SG, Genco RJ. Periodontal disease and diabetes mellitus: a two-way relationship. *Ann Periodontol* 1998,3(1):51-61.
44. Wang CH, Chueh LH, Chen SC, Feng YC, Hsiao CK, Chiang CP. Impact of diabetes mellitus, hypertension, and coronary artery disease on tooth extraction after nonsurgical endodontic treatment. *J Endod* 2011,37(1):1-5.
45. Lopez-Lopez J, Jane-Salas E, Estrugo-Devesa A, Velasco-Ortega E, Martin-Gonzalez J, Segura-Egea JJ. Periapical and endodontic status of type 2 diabetic patients in Catalonia, Spain: a cross-sectional study. *J Endod* 2011,37(5):598-601.

46. Mindiola MJ, Mickel AK, Sami C, Jones JJ, Lalumandier JA, Nelson SS. Endodontic treatment in an American Indian population: a 10-year retrospective study. *J Endod* 2006,32(9):828-832.
47. Loe H. Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1993,16(1):329-334.
48. Catanzaro O, Dziubecki D, Lauria LC, Ceron CM, Rodriguez RR. Diabetes and its effects on dental pulp. *J Oral Sci* 2006,48(4):195-199.
49. Siqueira JF, Jr. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002,94(3):281-293.
50. Fukada SY, Silva TA, Garlet GP, Rosa AL, da Silva JS, Cunha FQ. Factors involved in the T helper type 1 and type 2 cell commitment and osteoclast regulation in inflammatory apical diseases. *Oral Microbiol Immunol* 2009,24(1):25-31.
51. Takahashi K. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. *Int Endod J* 1998,31(5):311-325.
52. Teixeira-Salum TB, Rodrigues DB, Gervasio AM, Souza CJ, Rodrigues V, Jr., Loyola AM. Distinct Th1, Th2 and Treg cytokines balance in chronic periapical granulomas and radicular cysts. *J Oral Pathol Med* 2010,39(3):250-256.
53. Duarte PM, Miranda TS, Lima JA, Dias Goncalves TE, Santos VR, Bastos MF, et al. Expression of immune-inflammatory markers in sites of chronic periodontitis in patients with type 2 diabetes. *J Periodontol* 2012,83(4):426-434.
54. Morohoshi M, Fujisawa K, Uchimura I, Numano F. Glucose-dependent interleukin 6 and tumor necrosis factor production by human peripheral blood monocytes in vitro. *Diabetes* 1996,45(7):954-959.

55. Garcia-Hernandez A, Arzate H, Gil-Chavarria I, Rojo R, Moreno-Fierros L. High glucose concentrations alter the biomineralization process in human osteoblastic cells. *Bone* 2012,50(1):276-288.
56. Wang J, Li G, Wang Z, Zhang X, Yao L, Wang F, et al. High glucose-induced expression of inflammatory cytokines and reactive oxygen species in cultured astrocytes. *Neuroscience* 2012,202:58-68.
57. Lima SM, Grisi DC, Kogawa EM, Franco OL, Peixoto VC, Goncalves-Junior JF, et al. Diabetes mellitus and inflammatory pulpal and periapical disease: a review. *Int Endod J* 2013,46(8):700-709.
58. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998,93(2):165-176.
59. Mahamed DA, Marleau A, Alnaeeli M, Singh B, Zhang X, Penninger JM, et al. G(-) anaerobes-reactive CD4+ T-cells trigger RANKL-mediated enhanced alveolar bone loss in diabetic NOD mice. *Diabetes* 2005,54(5):1477-1486.
60. Vernal R, Dezerega A, Dutzan N, Chaparro A, Leon R, Chandia S, et al. RANKL in human periapical granuloma: possible involvement in periapical bone destruction. *Oral Dis* 2006,12(3):283-289.
61. Britto LR, Katz J, Guelmann M, Heft M. Periradicular radiographic assessment in diabetic and control individuals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003,96(4):449-452.
62. Taubman MA, Kawai T. Involvement of T-lymphocytes in periodontal disease and in direct and indirect induction of bone resorption. *Crit Rev Oral Biol Med* 2001,12(2):125-135.

63. Wittrant Y, Gorin Y, Woodruff K, Horn D, Abboud HE, Mohan S, et al. High d(+)glucose concentration inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis. *Bone* 2008,42(6):1122-1130.
64. Dienelt A, zur Nieden NI. Hyperglycemia impairs skeletogenesis from embryonic stem cells by affecting osteoblast and osteoclast differentiation. *Stem Cells Dev* 2011,20(3):465-474.
65. Williams JP, Blair HC, McDonald JM, McKenna MA, Jordan SE, Williford J, et al. Regulation of osteoclastic bone resorption by glucose. *Biochem Biophys Res Commun* 1997,235(3):646-651.
66. Kim JM, Jeong D, Kang HK, Jung SY, Kang SS, Min BM. Osteoclast Precursors Display Dynamic Metabolic Shifts toward Accelerated Glucose Metabolism at an Early Stage of RANKL-Stimulated Osteoclast Differentiation. *Cellular Physiology and Biochemistry* 2007,20(6):935-946.
67. Zayzafoon M, Stell C, Irwin R, McCabe LR. Extracellular glucose influences osteoblast differentiation and c-Jun expression. *J Cell Biochem* 2000,79(2):301-310.
68. Balint E, Szabo P, Marshall CF, Sprague SM. Glucose-induced inhibition of in vitro bone mineralization. *Bone* 2001,28(1):21-28.
69. Iwama A, Nishigaki N, Nakamura K, Imaizumi I, Shibata N, Yamasaki M, et al. The effect of high sugar intake on the development of periradicular lesions in rats with type 2 diabetes. *J Dent Res* 2003,82(4):322-325.
70. Zhen D, Chen Y, Tang X. Metformin reverses the deleterious effects of high glucose on osteoblast function. *J Diabetes Complications* 2010,24(5):334-344.
71. Iwama A, Morimoto T, Tsuji M, Nakamura K, Higuchi N, Imaizumi I, et al. Increased number of anaerobic bacteria in the infected root canal in type 2 diabetic rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006,101(5):681-686.

72. Ng YL, Mann V, Gulabivala K. A prospective study of the factors affecting outcomes of nonsurgical root canal treatment: part 1: periapical health. *Int Endod J* 2011,44(7):583-609.
73. Falk H, Hugoson A, Thorstensson H. Number of teeth, prevalence of caries and periapical lesions in insulin-dependent diabetics. *Scand J Dent Res* 1989,97(3):198-206.
74. Graves DT, Al-Mashat H, Liu R. Evidence that diabetes mellitus aggravates periodontal diseases and modifies the response to an oral pathogen in animal models. *Compend Contin Educ Dent* 2004,25(7 Suppl 1):38-45.
75. Fouad AF. Diabetes mellitus as a modulating factor of endodontic infections. *J Dent Educ* 2003,67(4):459-467.
76. Scarpello JH, Howlett HC. Metformin therapy and clinical uses. *Diab Vasc Dis Res* 2008,5(3):157-167.
77. Viollet B, Guigas B, Sanz Garcia N, Leclerc J, Foretz M, Andreelli F. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin Sci (Lond)* 2012,122(6):253-270.
78. DeFronzo RA, Goodman AM. Efficacy of metformin in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. The Multicenter Metformin Study Group. *N Engl J Med* 1995,333(9):541-549.
79. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 2001,108(8):1167-1174.
80. Musi N, Hirshman MF, Nygren J, Svanfeldt M, Bavenholm P, Rooyackers O, et al. Metformin increases AMP-activated protein kinase activity in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes. *Diabetes* 2002,51(7):2074-2081.

81. Fujii N, Aschenbach WG, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ. Regulation of glucose transport by the AMP-activated protein kinase. *Proc Nutr Soc* 2004,63(2):205-210.
82. Hardie DG, Carling D. The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? *Eur J Biochem* 1997,246(2):259-273.
83. Jang WG, Kim EJ, Bae IH, Lee KN, Kim YD, Kim DK, et al. Metformin induces osteoblast differentiation via orphan nuclear receptor SHP-mediated transactivation of Runx2. *Bone* 2011,48(4):885-893.
84. Gao Y, Xue J, Li X, Jia Y, Hu J. Metformin regulates osteoblast and adipocyte differentiation of rat mesenchymal stem cells. *J Pharm Pharmacol* 2008,60(12):1695-1700.
85. Cortizo AM, Sedlinsky C, McCarthy AD, Blanco A, Schurman L. Osteogenic actions of the anti-diabetic drug metformin on osteoblasts in culture. *Eur J Pharmacol* 2006,536(1-2):38-46.
86. Molinuevo MS, Schurman L, McCarthy AD, Cortizo AM, Tolosa MJ, Gangoiti MV, et al. Effect of metformin on bone marrow progenitor cell differentiation: in vivo and in vitro studies. *J Bone Miner Res* 2010,25(2):211-221.
87. Liu L, Zhang C, Hu Y, Peng B. Protective effect of metformin on periapical lesions in rats by decreasing the ratio of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand/osteoprotegerin. *J Endod* 2012,38(7):943-947.
88. Lovshin JA, Drucker DJ. Incretin-based therapies for type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* 2009,5(5):262-269.
89. Henriksen DB, Alexandersen P, Hartmann B, Adrian CL, Byrjalsen I, Bone HG, et al. Four-month treatment with GLP-2 significantly increases hip BMD: a randomized,

placebo-controlled, dose-ranging study in postmenopausal women with low BMD. *Bone* 2009,45(5):833-842.

90. Pereira M, Jeyabalan J, Jorgensen CS, Hopkinson M, Al-Jazzar A, Roux JP, et al. Chronic administration of Glucagon-like peptide-1 receptor agonists improves trabecular bone mass and architecture in ovariectomised mice. *Bone* 2015,81:459-467.

91. Mansur SA, Mieczkowska A, Bouvard B, Flatt PR, Chappard D, Irwin N, et al. Stable Incretin Mimetics Counter Rapid Deterioration of Bone Quality in Type 1 Diabetes Mellitus. *J Cell Physiol* 2015,230(12):3009-3018.

92. Nuche-Berenguer B, Moreno P, Esbrit P, Dapia S, Caeiro JR, Cancelas J, et al. Effect of GLP-1 treatment on bone turnover in normal, type 2 diabetic, and insulin-resistant states. *Calcif Tissue Int* 2009,84(6):453-461.

93. Nuche-Berenguer B, Lozano D, Gutierrez-Rojas I, Moreno P, Marinoso ML, Esbrit P, et al. GLP-1 and exendin-4 can reverse hyperlipidic-related osteopenia. *J Endocrinol* 2011,209(2):203-210.

94. Hansen MSS, Tencerova M, Frolich J, Kassem M, Frost M. Effects of gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1 and glucagon-like peptide-1 receptor agonists on Bone Cell Metabolism. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2018,122(1):25-37.

95. Hounsfield GN. Computerized transverse axial scanning (tomography). 1. Description of system. *Br J Radiol* 1973,46(552):1016-1022.

96. Marmulla R, Wortche R, Muhling J, Hassfeld S. Geometric accuracy of the NewTom 9000 Cone Beam CT. *Dentomaxillofac Radiol* 2005,34(1):28-31.

97. Estrela C, Bueno MR, Leles CR, Azevedo B, Azevedo JR. Accuracy of cone beam computed tomography and panoramic and periapical radiography for detection of apical periodontitis. *J Endod* 2008,34(3):273-279.

98. Gerlach NL, Meijer GJ, Borstlap WA, Bronkhorst EM, Berge SJ, Maal TJ. Accuracy of bone surface size and cortical layer thickness measurements using cone beam computerized tomography. *Clin Oral Implants Res* 2013,24(7):793-797.
99. Robb RA. The Dynamic Spatial Reconstructor: An X-Ray Video-Fluoroscopic CT Scanner for Dynamic Volume Imaging of Moving Organs. *IEEE Trans Med Imaging* 1982,1(1):22-33.
100. ER K. Endodontik Vakalarda Konik Işınlı Bilgisayarlı Tomografi Kullanımının Önemi. *Turkiye Klinikleri Endodontics-Special Topics* 2015,1(3):80-86.
101. Sogur E, Baksi BG, Grondahl HG, Sen BH. Pixel intensity and fractal dimension of periapical lesions visually indiscernible in radiographs. *J Endod* 2013,39(1):16-19.
102. Yeri EA. Mikro Bilgisayarlı Tomografi ve Endodontik Araştırmalardaki Yeri. *Turkiye Klinikleri J Endod-Special Topics* 2015,1(3):32-39.
103. Jung M, Lommel D, Klimek J. The imaging of root canal obturation using micro-CT. *Int Endod J* 2005,38(9):617-626.
104. Çivitçi F, Malkoç M. Diş Hekimliğinde Mikro BT'nin Kullanım Alanları. *Dental journal of Dicle* 2013,14:279-284.
105. Aoyagi H, Tsuchikawa K, Iwasaki S. Three-dimensional observation of the mouse embryo by micro-computed tomography: composition of the trigeminal ganglion. *Odontology* 2010,98(1):26-30.
106. Guldborg RE, Ballock RT, Boyan BD, Duvall CL, Lin AS, Nagaraja S, et al. Analyzing bone, blood vessels, and biomaterials with microcomputed tomography. *IEEE Eng Med Biol Mag* 2003,22(5):77-83.
107. Santana RB, Xu L, Chase HB, Amar S, Graves DT, Trackman PC. A role for advanced glycation end products in diminished bone healing in type 1 diabetes. *Diabetes* 2003,52(6):1502-1510.

108. Segura-Egea JJ, Castellanos-Cosano L, Machuca G, Lopez-Lopez J, Martin-Gonzalez J, Velasco-Ortega E, et al. Diabetes mellitus, periapical inflammation and endodontic treatment outcome. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2012,17(2):e356-361.
109. Segura-Egea JJ, Martin-Gonzalez J, Castellanos-Cosano L. Endodontic medicine: connections between apical periodontitis and systemic diseases. *Int Endod J* 2015,48(10):933-951.
110. Expert Committee on the D, Classification of Diabetes M. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2000,23 Suppl 1:S4-19.
111. Mealey BL, Oates TW, American Academy of P. Diabetes mellitus and periodontal diseases. *J Periodontol* 2006,77(8):1289-1303.
112. Iacopino AM. Periodontitis and diabetes interrelationships: role of inflammation. *Ann Periodontol* 2001,6(1):125-137.
113. Segura-Egea JJ, Martin-Gonzalez J, Cabanillas-Balsera D, Fouad AF, Velasco-Ortega E, Lopez-Lopez J. Association between diabetes and the prevalence of radiolucent periapical lesions in root-filled teeth: systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Investig* 2016,20(6):1133-1141.
114. Lecka-Czernik B. Diabetes, bone and glucose-lowering agents: basic biology. *Diabetologia* 2017,60(7):1163-1169.
115. Jeyabalan J, Viollet B, Smitham P, Ellis SA, Zaman G, Bardin C, et al. The anti-diabetic drug metformin does not affect bone mass in vivo or fracture healing. *Osteoporos Int* 2013,24(10):2659-2670.
116. Zhao J, Li Y, Zhang H, Shi D, Li Q, Meng Y, et al. Preventative effects of metformin on glucocorticoid-induced osteoporosis in rats. *J Bone Miner Metab* 2019.

117. Lai EH, Yang CN, Lin SK, Wang HW, Kok SH, Hong CY, et al. Metformin Ameliorates Periapical Lesions through Suppression of Hypoxia-induced Apoptosis of Osteoblasts. *J Endod* 2018,44(12):1817-1825.
118. Hadjidakis DJ, Androulakis, II. Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci* 2006,1092:385-396.
119. Meng J, Ma X, Wang N, Jia M, Bi L, Wang Y, et al. Activation of GLP-1 Receptor Promotes Bone Marrow Stromal Cell Osteogenic Differentiation through beta-Catenin. *Stem Cell Reports* 2016,6(4):579-591.
120. Ma X, Meng J, Jia M, Bi L, Zhou Y, Wang Y, et al. Exendin-4, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, prevents osteopenia by promoting bone formation and suppressing bone resorption in aged ovariectomized rats. *J Bone Miner Res* 2013,28(7):1641-1652.
121. Pereira M, Gohin S, Roux JP, Fisher A, Cleasby ME, Mabileau G, et al. Exenatide Improves Bone Quality in a Murine Model of Genetically Inherited Type 2 Diabetes Mellitus. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2017,8:327.
122. Nuche-Berenguer B, Moreno P, Portal-Nunez S, Dapia S, Esbrit P, Villanueva-Penacarrillo ML. Exendin-4 exerts osteogenic actions in insulin-resistant and type 2 diabetic states. *Regul Pept* 2010,159(1-3):61-66.
123. Fouad AF HG. Chapter 9: Inflammation and immunological response. In: Rotstein I, ed. *Ingle's Endodontics, 7th edn.* 2015.
124. Katayama Y, Akatsu T, Yamamoto M, Kugai N, Nagata N. Role of nonenzymatic glycosylation of type I collagen in diabetic osteopenia. *J Bone Miner Res* 1996,11(7):931-937.
125. Miyata T, Notoya K, Yoshida K, Horie K, Maeda K, Kurokawa K, et al. Advanced glycation end products enhance osteoclast-induced bone resorption in

cultured mouse unfractionated bone cells and in rats implanted subcutaneously with devitalized bone particles. *J Am Soc Nephrol* 1997,8(2):260-270.

126. Kasai T, Bandow K, Suzuki H, Chiba N, Kakimoto K, Ohnishi T, et al. Osteoblast differentiation is functionally associated with decreased AMP kinase activity. *J Cell Physiol* 2009,221(3):740-749.

127. Mansur SA, Mieczkowska A, Flatt PR, Chappard D, Irwin N, Mabileau G. The GLP-1 Receptor Agonist Exenatide Ameliorates Bone Composition and Tissue Material Properties in High Fat Fed Diabetic Mice. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2019,10:51.

128. Bak EJ, Park HG, Kim M, Kim SW, Kim S, Choi SH, et al. The effect of metformin on alveolar bone in ligature-induced periodontitis in rats: a pilot study. *J Periodontol* 2010,81(3):412-419.

129. Gao Y, Li Y, Xue J, Jia Y, Hu J. Effect of the anti-diabetic drug metformin on bone mass in ovariectomized rats. *Eur J Pharmacol* 2010,635(1-3):231-236.

130. Mai QG, Zhang ZM, Xu S, Lu M, Zhou RP, Zhao L, et al. Metformin stimulates osteoprotegerin and reduces RANKL expression in osteoblasts and ovariectomized rats. *J Cell Biochem* 2011,112(10):2902-2909.

131. Horowitz MC, Xi Y, Wilson K, Kacena MA. Control of osteoclastogenesis and bone resorption by members of the TNF family of receptors and ligands. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001,12(1):9-18.

132. Schell H, Lienau J, Epari DR, Seebeck P, Exner C, Muchow S, et al. Osteoclastic activity begins early and increases over the course of bone healing. *Bone* 2006,38(4):547-554.

133. Takahashi N, Akatsu T, Udagawa N, Sasaki T, Yamaguchi A, Moseley JM, et al. Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology* 1988,123(5):2600-2602.

134. Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, Sasaki T, Yamaguchi A, Kodama H, et al. The bone marrow-derived stromal cell lines MC3T3-G2/PA6 and ST2 support osteoclast-like cell differentiation in cocultures with mouse spleen cells. *Endocrinology* 1989,125(4):1805-1813.
135. Delamaire M, Maugendre D, Moreno M, Le Goff MC, Allannic H, Genetet B. Impaired leucocyte functions in diabetic patients. *Diabet Med* 1997,14(1):29-34.
136. Salvi GE, Carollo-Bittel B, Lang NP. Effects of diabetes mellitus on periodontal and peri-implant conditions: update on associations and risks. *J Clin Periodontol* 2008,35(8 Suppl):398-409.





