

T.C.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI

**DIABETİK RATLARDA DÜŞÜK DOZ DOKSİSİKLİN VE BİFOSFONAT  
KLODRONAT KULLANIMININ ALVEOLER KEMİK KAYBI VE DİŞETİ  
MATRİKS METALLOPROTEİNAZ -2, -9 VE INTERLÖKİN-1 $\beta$   
DÜZEYLERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN HİSTOLOJİK VE  
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL OLARAK İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

**Dt. Selin PINAR ÖZDEMİR**

Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Bülent KURTİŞ

ANKARA  
Mart 2009

T.C.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI

**DIABETİK RATLARDA DÜŞÜK DOZ DOKSİSİKLİN VE BİFOSFONAT  
KLODRONAT KULLANIMININ ALVEOLER KEMİK KAYBI VE DİŞETİ  
MATRİKS METALLOPROTEİNAZ -2, -9 VE INTERLÖKİN-1 $\beta$   
DÜZEYLERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN HİSTOLOJİK VE  
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL OLARAK İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

**Dt. Selin PINAR ÖZDEMİR**

Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Bülent KURTİŞ

Bu tez Gazi üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından  
03/2005-10 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA  
Mart 2009

T.C.

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Periodontoloji Ana Bilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma  
aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

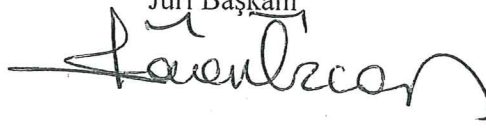
Tez Savunma Tarihi:18/03/2009

İmza

Prof. Dr. Gönen ÖZCAN

Gazi Üniversitesi

Jüri Başkanı



İmza

Prof. Dr. Bülent KURTIŞ

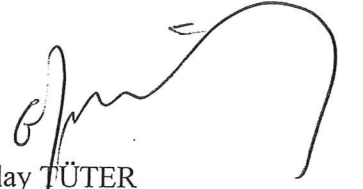
Gazi Üniversitesi



İmza

Prof. Dr. Gülay TÜTER

Gazi Üniversitesi



İmza

Doç.Dr. Sibel Elif GÜLTEKİN

Gazi Üniversitesi



İmza

Prof. Dr. Dilek ŞENGÜN

Hacettepe Üniversitesi



## **İÇİNDEKİLER**

<b>Kabul ve onam</b>	<b>I</b>
<b>İçindekiler</b>	<b>II</b>
<b>Şekiller</b>	<b>IV</b>
<b>Tablolar</b>	<b>V</b>
<b>Resimler</b>	<b>VI</b>
<b>Kısaltmalar</b>	<b>VIII</b>
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>6</b>
2.1. Diabetin Periodonsiyum Üzerine Etkisi	9
2.2. Periodontal Hastalığın Diabetik Durum Üzerine Etkisi	16
2.3. Periodontal Hastalıklarda Sitokinlerin Rolü	17
2.4. Matriks Metalloproteinazlar	19
2.5. Konak Modifikasyon Tedavisi	24
2.6. Tetrasiklinler	25
2.6.1. Kimyasal Olarak Modifiye Tetrasiklinler (KOMT)	29
2.6.2. Subantimikrobiyal Doz Doksisisiklin (SDD)	30
2.7. Bifosfonatlar	31
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>44</b>
3.1. İmmünohistokimyasal Yöntem	51
3.2. İmmünohistokimya Boyanmalarının Değerlendirilmesi	53
3.3. Alveoler Kemik Kaybının Ölçümü	54
3.4. İstatistiksel Değerlendirme	55
<b>4. BULGULAR</b>	<b>56</b>
4.1. Klinik, Histolojik ve Histomorfometrik Bulgular	56
4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular	63
<b>5. TARTIŞMA</b>	<b>76</b>
<b>6. SONUÇ</b>	<b>92</b>
<b>7. ÖZET</b>	<b>94</b>

<b>8. SUMMARY</b>	<b>96</b>
<b>9. KAYNAKLAR</b>	<b>98</b>
<b>10. ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>131</b>
<b>11. TEŞEKKÜR</b>	<b>132</b>
<b>12. Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul Kararı</b>	<b>134</b>

## ŞEKİLLER

- Şekil 1:** Diabet ve periodontitis arasındaki ilişkiye ait mekanizmalar
- Şekil 2:** KMT 'nin etki mekanizması
- Şekil 3:** Tetrasiklinin kimyasal yapısı ( $C_{22}H_{24}N_2O_8$ )
- Şekil 4:** Doksisisiklinin kimyasal yapısı ( $C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot H_2O$ )
- Şekil 5:** Bifosfonat ve pirofosfatın kimyasal yapısı
- Şekil 6:** Bifosfonatların kemik rezorpsiyonunu inhibe etme yolları
- Şekil 7:** Çalışma planı
- Şekil 8:** Gruplar Arasında İnflamasyon Skorlarının Dağılımı
- Şekil 9:** Gruplar Arasında Mine Sement Hududu – Alveoler Kret Mesafesinin Dağılımı
- Şekil 10:** Gruplar Arasında Mobilite Skorlarının Dağılımı
- Şekil 11:** Gruplar Arasında MMP-9 Bağ Doku Ekspresyon Skorlarının Dağılımı
- Şekil 12:** Gruplar Arasında IL-1 $\beta$  Bağ Doku Ekspresyon Skorlarının Dağılımı
- Şekil 13:** Mine Sement Hududu – Alveoler Kret Mesafesi ile İnflamasyon Skoru Arasındaki Saçılım Grafiği
- Şekil 14:** Mine Sement Hududu – Alveoler Kret Mesafesi ile Mobilite Skoru Arasındaki Saçılım Grafiği
- Şekil 15:** İnflamasyon ile Mobilite Skorları Arasındaki Saçılım Grafiği
- Şekil 16:** MMP-9 ile IL-1 $\beta$  Bağ Doku Ekspresyon Skorları Arasındaki Saçılım Grafiği

## TABLULAR

**Tablo 1:** Diabetes Mellitus' un sınıflandırılması

**Tablo 2:** Tip 1 ve tip 2 diabetin özellikleri

**Tablo 3:** HbA1c ve ortalama plazma glukoz seviyelerinin korelasyonu

**Tablo 4:** MMP enzimlerinin sınıflandırılması

**Tablo 5:** Gruplara göre ratların ilk-son ağırlık ve ilk-son kan glukoz ortalama değerleri

**Tablo 6:** Gruplar arası inflamasyon ve mobilite skorlarının dağılımı (ortanca (%25-%75 yüzdelik)) ve mine sement hududu - alveoler kret arası mesafe (ortalama $\pm$ SS)

**Tablo 7:** Gruplar arası dişeti bağ dokusu MMP-9, MMP-2, IL-1 $\beta$  immünohistokimyasal ekspresyon skorları (ortanca(%25-%75 yüzdelik))

**Tablo 8:** Mine Sement Hududu – Alveoler Kret Mesafesi ile İnflamasyon, MMP-9, MMP-2,IL-1 $\beta$  Ekspresyon Skorları ve Mobilite skorları Arasındaki Korelasyon Katsayıları ve Önemlilik Düzeyleri

**Tablo 9:** İnflamasyon, MMP-9, MMP-2, IL-1 $\beta$  Bağ Doku Skorları ve Mobilite Düzeylerinin Birbiri Arasındaki Korelasyon Katsayıları ve Önemlilik Düzeyleri

## RESİMLER

- Resim 1:** Ratların vücut ağırlığının ölçülmesi
- Resim 2:** Ratların kan glukoz seviyelerinin tesbiti amacıyla kuyruk veninden kan alımı ve glukometre cihazı ile ölçümü
- Resim 3:** Deneysel diabetes oluşturmak amacıyla kullanılan STZ
- Resim 4:** STZ ağırlıklarının tesbiti amacıyla kullanılan hassas terazi
- Resim 5:** STZ' in sitrat tamponuyla karıştırılması
- Resim 6:** Deneysel diabetes oluşturmak amacıyla hazırlanmış STZ' in ratlara intraperitoneal olarak enjekte edilmesi
- Resim 7:** Deneysel periodontitis oluşturmak amacıyla rat üst çenesinde 2. molar diş çevresine yerleştirilen 3.0 ipek suture
- Resim 8:** Ratlara oral yolla doksisisiklin verilmesi
- Resim 9:** Ratlara subkutan yolla klodronat enjeksiyonu
- Resim 10:** Grup 1' e ait keratinize (k) çok katlı yassı epitel (e) ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu içermeyen bağ dokusu (bd) görüntüsü (x 100, H&E).
- Resim 11:** Grup 2' ye ait çok katlı yassı epitel (e) altında, bağ dokusunda (bd) yoğun lenfositik infiltrasyon (oklar) görüntüsü (x 100, H&E).
- Resim 12:** Grup 3' e ait çok katlı yassı epitel (e) altında, bağ dokusunda (bd) yoğun lenfositik infiltrasyon görüntüsü (x 100, H&E).
- Resim 13:** Grup 4 'e ait çok katlı yassı epitel (e) altında, bağ dokusunda (bd) yoğun lenfositik infiltrasyon (x 100, H&E).
- Resim 14:** Grup 5' e ait çok katlı yassı epitel (e) altında, bağ dokusunda (bd) yoğun lenfositik infiltrasyon (x 100, H&E).
- Resim 15:** Örneklerin %1'lik metilen mavisiyle boyandıktan sonra x 20 büyütmede çekilen fotoğrafları. Kontrol grubu (a) ve deneysel periodontitis oluşumu sonucu görülen alveoler kemik kaybı (b). m: mine, s: sement, msh: mine-sement hududu
- Resim 16:** Grup 1'e ait bazal tabaka hücreleri hariç epitelin (e) tüm

tabakalarında ve inflamatuvar hücrelerde hafif izlenen MMP-9 pozitifliği görüntüsü (x100, DAB). bd: bağ dokusu

**Resim 17:** Grup 2'ye ait epitelin (e) bazal tabaka hücreleri hariç tüm tabakalarında ve inflamatuvar hücrelerde izlenen yoğun MMP-9 pozitifliği görüntüsü (x100, DAB). bd: bağ dokusu

**Resim 18:** Grup 3' e ait çok katlı yassı epitelde (e) ve bağ dokusunda (bd) izlenen zayıf MMP-9 ekspresyonu görüntüsü (x100, DAB).

**Resim 19:** Grup 4'e ait keratinositlerde (k) ve bağ dokusunda (bd) izlenen zayıf MMP-9 ekspresyonu görüntüsü (x200, DAB).

**Resim 20:** (a,b). Grup 5'e ait keratinositler (k) ve bağ dokusundaki (bd) inflamatuvar hücrelerde izlenen hafif MMP-9 pozitifliği görüntüsü (a:x100, b:x200, DAB).

**Resim 21:** Epitel (e) ve bağ dokusu (bd) hücrelerinde MMP-2 pozitifliğinin izlenemediği bir örnek görüntü (x100,DAB).

**Resim 22:** Grup 1'e ait keratinositlerde (k), endotellerde (üçgen oklar) ve İnflamatuvar hücrelerde (oklar) izlenen IL-1 $\beta$  pozitifliği görüntüsü (x100, DAB).

**Resim 23:** (a). Grup 2'ye ait çok katlı yassı epitelde (e) hem sitoplazmik hem de yoğun nükleer IL-1 $\beta$  boyanma görüntüsü (x100, DAB). bd: bağ dokusu

**Resim 24:** (b). Grup 2'ye ait doku derinliklerinde inflamatuvar hücrelerde ve endotellerde (oklar)IL-1 $\beta$  pozitifliği görüntüsü (x200, DAB). bd: bağ dokusu

**Resim 25:** Grup 3'e ait bağ doku hücrelerinde (bd) ve keratinositlerde nükleer IL-1 $\beta$  pozitifliği (ok) görüntüsü (x200,DAB).

**Resim 26:** Grup 4' e ait epitelde (e) ve bağ doku (bd) hücrelerinde IL-1 $\beta$  ekspresyonunun izlenemediği bir örnek görüntü (x100, DAB).

**Resim 27:** Grup 5'e ait çok katlı yassı epitelde (e) zayıf izlenen IL-1 $\beta$  pozitifliği görüntüsü (x100, DAB). bd: bağ dokusu

## KISALTMALAR

- MDP:** Mikrobiyal dental plak  
**KMT:** Konak modifikasyon tedavisi  
**LPS:** Lipopolisakkarit  
**JE:** Junctional epitel  
**PMNL:** Polimorfonükleer lökosit  
**MMP:** Matriks metalloproteinaz  
**ECM:** Ekstraselüler matriks  
**IL:** İnterlökin  
**TNF- $\alpha$ :** Tümör nekroz faktör- $\alpha$   
**PGE<sub>2</sub>:** Prostoglandin E<sub>2</sub>  
**MMDI:** Matriks metalloproteinaz doku inhibitörü  
**NSAID:** Non steroidal antiinflamatuvar ilaçlar  
**BF:** Bifosfonat  
**HA:** Hidroksiapaptit  
**T1D:** Tip 1 Diabet  
**T2D:** Tip 2 Diabet  
**HbA1c:** Hemoglobin A1c  
**CPITN:** Community periodontal index of treatment needs  
**DOS:** Dişeti oluşu sıvısı  
**P. intermedia:** Prevotella intermedia  
**W. recta:** Wolinella recta  
**P. gingivalis:** Porphyromonas gingivalis  
**AGE :** Advanced glycation end products  
**LDL:** Düşük yoğunluklu lipoprotein  
**VEBF:** Vasküler endotelial büyüme faktör  
**RAGE :** AGE reseptörü  
**NF-  $\kappa$ B:** Nuclear faktör kappa B  
**IL-1Ra:** IL-1 reseptör antagonisti  
**IL-1R1:** IL-1reseptör 1

**IL-1R2:** IL-1 reseptör 2  
**HOCI:** Hipokloröz asit  
 **$\alpha$ 1-PI :**  $\alpha$ 1-proteinaz inhibitörü  
**KOMT:** Kimyasal Olarak Modifiye Tetrasiklinler  
**SDD:** Subantimikrobiyal Doz Doksisisiklin  
**KDK:** Kök yüzeyi düzeltmesi ve kazınması  
**FDA:** Food and Drug Administration  
**PF:** Pirofosfat  
**AMP:** Adenozin monofosfat  
**N-BP :** Nitrojen içeren Bifosfonat  
**OPG:** Osteoprotegrin  
**RANKL:** Nükleer faktör kappa B ligand reseptör aktivatörü  
**LTB4:** Lökotrien B<sub>4</sub>  
**PAF :** Platelet aktivasyon faktörü  
**PGF<sub>2 $\alpha$</sub> :** Prostoglandin F<sub>2 $\alpha$</sub>   
**STZ:** Streptozotozin  
**H&E:** Hemaotoksilen-eozin  
**ABC:** Avidin-Biyotin Kompleks  
**PBS:** Fosfatla tamponlanmış serum  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> :** Hidrojen peroksit  
**NAD:** Nikotinamid adenin dinükleotid  
**Ntx :** İdrar N-telopeptid  
**E.coli:** Escherichia coli

## GİRİŞ

Periodontitis periodonto-patojenik mikroorganizmaların sebep olduğu ataşman kaybı ve alveoler kemik yıkımına neden olan ve diş kaybıyla sonuçlanabilen inflamatuvar bir hastalıktır.<sup>1</sup> Periodontal hastalıklarda primer etyolojik etkenin mikrobiyal dental plak (MDP) olduğu bilinmekle birlikte son yıllarda iltihabi karakterde olan periodontal hastalığın başlaması ve ilerlemesinde plak bakteri ve ürünlerine karşı konak dokuda gelişen hücresel ve hümoral cevabında önemli bir rol oynadığı anlaşılmıştır.<sup>2</sup>

Periodontal patogeneizde konak inflamatuvar cevabının önemi anlaşıldıktan sonra periodontitis tedavisinde konak cevabı modifikasyonu adı verilen yeni tedavi yöntemleri üzerinde çalışmalara başlanılmıştır.<sup>3</sup> Konak modifikasyon tedavisi (KMT) konak cevabının yıkıcı yönünü modifiye etmek veya azaltmak amacıyla kullanılan ve böylece plağa karşı gelişen immüno - inflamatuvar cevabı periodontal dokulara daha az zarar verici hale getiren tedavi şeklidir.<sup>4</sup>

Subgingival plak bakterilerinin dişeti oluşuna akümülyasyonunu takiben, lipopolisakkaritler (LPS), mikrobiyal peptidler ve diğer bakteriyel antijenler gibi kemotaktik faktörler junctional epitelden (JE) dişeti bağ dokusuna difüze olurlar. Böylece epitelyal ve bağ doku hücreleri uyarılarak inflamatuvar mediatörler üretilir ve dokuda inflamatuvar cevap gelişir.<sup>4,5</sup> Kapiller damarlarda dilatasyon, sıvı ve hücresel geçirgenlikte artışla birlikte defans hücreleri dolaşımdan dişeti oluşundaki kemotaktik uyarılara doğru migre olurlar. Polimorfonükleer lökositler (PMNL) gingival inflamasyonun erken dönemlerinde sayıca baskındırlar ve bu hücreler plak bakterilerini fagosite eder ve öldürürler. Bakteriyel ürünlerin dolaşıma girmesiyle, lenfositler infeksiyon alanına dönerler ve B lenfositler plazma hücrelerine dönüşürler.<sup>4-7</sup> Plazma hücreleri spesifik bakteriyel

antijenlere karşı antikor üretirler. Bu antikorlar gingival dokulara salınır ve kompleman varlığında PMNL fagositozu ve bakteriyel öldürme kolaylaşır ve artar. Böylece gingival dokularda konak immüno - inflamatuvar cevap kurulur ve gingivitisin klinik belirtileri gelişir. Bu cevabın amacı bakteriyel enfeksiyona müdahale etmek ve bakterinin dokulara girişini önlemektir.<sup>4</sup> Periodontitise dirençli bireylerde, primer defans mekanizması enfeksiyonu başlangıç aşamasında kontrol eder.<sup>5,8</sup> Hastalığa duyarlı bireylerde ise bu kontrol mekanizması zayıf olduğu için inflamatuvar olaylar apikal ve laterale doğru ilerleyerek derin bağ dokuya ve alveoler kemiğe yayılır. JE'deki proliferasyon permabilitede artış ve ülserasyona neden olur ve böylece bakteriyel ürünlerin girişi hızlanır ve inflamasyon ilerler.<sup>8</sup> Makrofajları ve lenfositleri içeren çok sayıdaki defans hücresi ve PMNL dokulara migre olarak aşırı miktarda yıkıcı enzimler ve inflamatuvar mediatörler salgırlar.<sup>4</sup> Matriks metalloproteinazlar (MMP) olarak isimlendirilen bu enzimler, ekstraselüler matriks (ECM) yıkımında önemli rol oynamaktadır. Konak hücreleri tarafından salınan  $Zn^{+2}$  bağlı endopeptidazların önemli bir ailesi olan MMP'ler embriyolojik gelişim, doku remodelasyonu, tükürük bezi morfogenezisi, diş erüpsiyonu gibi fizyolojik olaylarda ve bunlara ek olarak periodontal hastalık, artrit, ateroskleroz, pulmoner amfizem, osteoporoz, otoimmün ülseratif deri lezyonları ve aynı zamanda tümör hücre invazyonu ve metastazını içeren patolojik durumlardaki ECM yıkımından sorumludurlar<sup>9</sup>.

Makrofajların bölgeye toplanıp aktive olmasıyla MMP lere ilaveten prostoglandin, interlökinler (IL) ve tümör nekroz faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) gibi mediatörler de üretilir.<sup>4</sup> Sitokinler inflamasyon ve yara iyileşmesini yönlendiren ve düzenleyen mediatörlerdir.<sup>10</sup> IL-1, geniş biolojik aktivitelere sahip ve inflamasyon sırasında bazı genlerin ekspresyonunu direkt olarak düzenleyebilen<sup>113</sup> periodontal doku yıkımında ana role sahip proinflamatuvar bir sitokindir<sup>93,94</sup>. IL'ler ve TNF- $\alpha$  fibroblastlara bağlanarak daha fazla prostoglandin  $E_2$  (PGE<sub>2</sub>) , IL, TNF- $\alpha$  ve MMP üretilmesini

stimule ederler (pozitif feedback döngüsü). Hastalıklı periodontal dokularda bu enzimlerin ve inflamatuvar mediatörlerin konsantrasyonu patolojik olarak yüksektir. MMP' ler gingival kolajen lifleri yıkarak dişeti dokularının normal anatomik yapısının bozulmasına yol açar ve bu da periodontal destek dokuların yıkımıyla sonuçlanır. İnflamasyon böylece apikale doğru ilerler ve MMP lerin yıkıcı etkisine ilaveten dokuda yüksek seviyelerde bulunan prostoglandinler, IL'ler ve TNF- $\alpha$  alveoler kemiğin rezorpsiyonu için osteoklastları stimule ederler. <sup>4</sup>

Proinflamatuvar veya yıkıcı mediatörlerdeki artış sitokinlerden IL-4, IL-10, interlökin-1 reseptör antagonist (IL-1ra) ve matriks metalloproteinaz doku inhibitörü (MMDI) gibi antiinflamatuvar veya koruyucu mediatörlerdeki artışla dengelenir. Sağlık durumunda, antiinflamatuvar veya koruyucu mediatörler doku yıkımını kontrol etmeye yardım ederler. Konak cevabını, bakteriyel ürünlere karşı koruyacak bu mediatörler yeterli seviyelerde ise, birey hastalığa karşı dirençlidir. Yüksek seviyedeki proinflamatuvar veya yıkıcı mediatörlerle inhibitörler arasında bir dengesizlik varsa konakta doku yıkımı meydana gelmektedir. <sup>4 5,8</sup>

Diabetes mellitus insülin salgılanması, etkinliği veya her ikisindeki bozukluklar sebebiyle görülen hiperglisemiyle karakterize bir hastalıktır. <sup>11</sup> Türk toplumun %7,2' lik popülasyonunu diabetik hastaların oluşturduğu ve bu oranın gün geçtikçe arttığı bildirilmiştir. <sup>5</sup> Diabet, gingivitis ve periodontitis için risk faktörü olarak kabul edilmektedir <sup>12</sup> hatta periodontal hastalığı diabetin 6. komplikasyonu olarak bildiren yayınlar bulunmaktadır. <sup>13,14</sup> Diabetik bireylerde periodontal hastalık görülme oranındaki sıklığın ve yara iyileşmesindeki gecikmenin <sup>15</sup>, nötrofil bağlanması <sup>16</sup>, kemotaksisi <sup>17,18</sup> ve fagositozunda <sup>19,20</sup> bozulma monosit/makrofaj hücre hattının bakteriyel antijene karşı aşırı cevap göstermesi ve bu cevabın proinflamatuvar sitokinler ve mediatörlerin

üretiminde belirgin artışa yol açması<sup>21,22</sup> sebebiyle olduğu düşünülmektedir.

Son yıllarda üzerinde yoğun çalışmaların yapıldığı konak modifiye edici ajanlar; non steroidal antiinflamatuvar ilaçlar (NSAID), bifosfonatlar (BF), ve tetrasiklinlerdir.<sup>4</sup> KMT'nin amacı sitokinler (IL ve TNF- $\alpha$ ), prostaglandinler ve MMP' lerin inhibe edilmesidir. Konak modifikasyon tedavisi pozitif feedback döngüyü kesmede kullanılabilir ve dokuda yüksek seviyede bulunan sitokin, prostoglandin ve yıkıcı enzimlerin seviyeleri bu yöntemle azaltılabilir. Osteoklastların kendisi de KMT için hedeflerdir. Konak modifiye edici ajanlar osteoklastik aktiviteyi azaltmada ve kemik rezorpsiyonunu inhibe etmekte kullanılabilir.<sup>4</sup>

Postmenopozal osteoporozun tedavisinde sıklıkla kullanılan<sup>10</sup> BF'lar, pirofosfatların kimyasal analoglarıdır ve kemik rezorpsiyon inhibitörleri olarak bilinmektedirler.<sup>23</sup> BF'ların hidroksiapatit (HA) kristallerine bağlanıp, çözünmesini önleyerek kemik rezorpsiyonunu engellediği düşünülmektedir.<sup>24</sup>

Tetrasiklinlerin antibakteriyel etkilerinden bağımsız olarak, antikolajenaz özelliklerinin olduğu ve bu etkinin tetrasiklin grubu ilaçlar içinde en çok yarı sentetik bir tetrasiklin türevi olan doksisisiklinlerde bulunduğu bildirilmiştir. Bu ilaçların anti-metalloproteinaz etkileriyle birlikte prostaglandin sentezinin inhibisyonu, reaktif oksijen metabolitlerin üretimini engelleme ve diş yüzeylerine topikal olarak uygulandıklarında fibroblast aktivitesini arttırabilme özellikleri olduğu bildirilmiştir.<sup>25</sup>

Literatür incelendiğinde bifosfonatlar ve düşük doz doksisisiklinlerin ratlarda kemik rezorpsiyonunu inhibe edebileceği<sup>26</sup> ve periodontal doku yıkımında rol oynayan major inflamatuvar mediatörlerde belirgin inhibisyon sağlayabileceği ayrıca bu ajanların kombine

kullanımının sinerjistik etki sağlayarak alveoler kemik yıkımını azaltabileceği bildirilmiştir.<sup>27-29</sup>

Diabetik bireylerde konak cevabında grlen değişiklikler ve periodontal hastalık gelişimindeki artış göz önüne alındığında diabet ve periodontitisin dişeti MMP ve IL seviyeleri üzerine etkisini inceleyen çok az sayıda araştırma bulunduğu ve konak modifikasyon ajanlarından bifosfonat ve düşük doz doksisisiklinin bu parametreler ve alveoler kemik kaybı seviyesi üzerine etkisinin incelendiği bir araştırmanın ise taranan literatür bilgilerimiz dahilinde bulunmadığı görülmüştür .

Yukarıdaki bilgiler ışığında bu araştırma projesinin amacı, diabetik ratlarda düşük doz doksisisiklin ve bifosfonatların tek tek ve kombine uygulamalarının periodontal iyileşme, dişeti MMP-2, MMP-9 ve IL-1 $\beta$  düzeyleri ve alveoler kemik seviyesi üzerine etkilerini incelemektir.

## GENEL BİLGİLER

Diabet (Diabetes mellitus) karbonhidrat, lipid ve protein metabolizmasını etkileyen klinik ve genetik metabolik bir bozukluktur.<sup>11,30</sup> Diabetin temel karakteristik özelliği hiperglisemi olarak adlandırılan kan glukoz seviyelerindeki anormal yükselmedir. Hiperglisemi, pankreatik  $\beta$  hücreleri disfonksiyonuna ve/veya karaciğer ve kaslarda insülin direnci sebebiyle insülin salgılanmasındaki eksikliğe bağlı olarak görülür.<sup>30</sup>

Bugün kullanılan diabet sınıflaması hastalığın patofizyolojisi üzerine kurulmuştur.<sup>30</sup> Diabet için kabul edilen diagnostik katagoriler: Tip 1 Diabet (T1D), Tip 2 Diabet (T2D), bozulmuş glukoz toleransı, bozulmuş açlık glukozu, hamilelik diabeti, pankreas hastalıkları, ilaç tedavileri, endokrinopatiler, enfeksiyonlar ve genetik bozukluklardır (Tablo 1). Bozulmuş glukoz toleransı ve bozulmuş açlık glukozu diabetik ve normal glukoz metabolizması arasındaki kritik kan glukoz seviyesini açıklamak için kullanılan terimlerdir.<sup>14</sup> T1D, pankreatik  $\beta$  hücrelerinin hücresel otoimmün yıkımı sonucu görülmektedir ve total insülin sekresyonunun da kayıba yol açar.<sup>11</sup> T1D' li hastalarda insülin üretimindeki eksiklik dışardan insülin kullanımını mecburi hale getirir. İnsülin eksikliğinde bu hastalarda ketoasidoz gelişebilir.<sup>11</sup> Eski sınıflamada insüline bağımlı olmayan diabet olarak adlandırılan T2D' de insülin rezistansı ve izafi yetersizliği görülür.<sup>11</sup> T2D' de  $\beta$  hücrelerinde otoimmün yıkım bulunmamaktadır ve hastalarda insülin üretme kapasitesi vardır. T2D' li hastalarda insülin üretildiği için T1D' li hastalarla karşılaştırıldığında ketoasidoz gelişme insidansı daha düşüktür. Buna rağmen ketoasidoz, enfeksiyon gibi başka hastalıklar sebebiyle de gelişebilir (Tablo 2).<sup>11,30</sup>

**Tablo 1:** Diabetes Mellitusun sınıflandırılması <sup>11</sup>

I. Tip 1 diabet	
II. Tip 2 diabet	
III. Hamilelik diabeti	
IV. Diabetin diğer tipleri	
A. $\beta$ -hücre fonksiyonundaki genetik bozukluklar	
-Kromozom 12, Hepatik Nükleer Faktör (HNF)-1 $\alpha$ (MODY 3),	
-Kromozom 7, Glukokinaz (MODY 2)	
-Kromozom 20, HNF-4 $\alpha$ (MODY 1)	
-Kromozom 13, İnsülin Promotor Faktör - 1 (IPF-1;MODY 4)	
-Kromozom 17, HNF-1 $\beta$ (MODY 5)	
-Kromozom 2, Neuro D1 (MODY 6)	
-Mitokondrial DNA	
B. İnsülin işlevindeki genetik bozukluklar	Tip A insülin Direnci, Leprehaunism, Rabson-Mendenhall Sendromu, Lipoatrofik diabet
C. Pankreas Hastalıkları Yada Yaralanmaları	Pankreatit, neoplazi, hemokromatozis, kistik fibrozis, travma/ pankreatektomi, fibrokalkülöz pankreatopati
D. Enfeksiyonlar	Konjenital rubella, sitomegalovirus,
E. İlaç-Kaynaklı veya Kimyasal-Kaynaklı Diabetler	Glukokortikoidler, tiroid hormonu, dilatant, tiazidler, pentamidin, diazoksid, $\beta$ -adrenerjik agonistler, nikotik asit, $\alpha$ - interferon
F. Endokrinopati	Akromegali, Cushing sendromu, Glukagonoma, Feokromositom, Hipertiroidizm, Somatostatinoma, Aldesteronoma
G . Diabet İle İlişkili Diğer Genetik Sendromlar	Down sendromu, Huntington kore, Miyotonik distrofi, Klinefelter sendromu, Turner sendromu, Wolfram sendromu, Friedrich ataksisi, Laurence-moon-biedl sendromu, Porfiri, Prader willi sendromu
H. İmmün Aracılıklı Diabetin Nadir Formları	Stiff-man sendromu, Anti insülin antikorları

**Tablo 2:** Tip 1 ve tip 2 diabetin özellikleri<sup>14</sup>

	Tip 1 diabet	Tip 2 diabet
Başlangıç yaşı	Genellikle < 30 yaş	Genellikle erişkinlerde
Irksal yatkınlık	Beyaz	Siyah, Latin, Amerikan yerlisi, Pasifik adalı
Aile hikayesi	Yaygın	Tip 1'den daha yaygın
En yaygın morfortip	Zayıf ya da normal	Obez
Hastalığın klinik başlangıcı	Ani	Yavaş
Patofizyoloji	Otoimmün $\beta$ -hücresi yıkımı	İnsülin direnci, bozulmuş insülin sekresyonu, karaciğer glukoz üretiminde artış
Endojenik insülin üretim	Yok	Azalmış, normal veya seviyesi artmış (hastalığın safhasına bağlı)
Ketoasidoz gelişimine Yatkınlık	Yüksek	Düşük
Tedavi şekilleri	İnsülin, diyet, egzersiz	Diyet, egzersiz, oral ajanlar, insülin

Teşhis edilmiş diabeti olan bir hastada Hemoglobin A1c (HbA1c) testi hastanın glisemik kontrolünü monitorize etmek için kullanılır.<sup>31</sup> Glukohemoglobin eritrositlerde glukoz ve hemoglobin proteininin non-enzimatik reaksiyonunun ürünü olarak oluşur. Glukozun hemoglobine bağlanması yüksek stabildedir. Bu nedenle hemoglobin, eritrositin yaşam süresi boyunca ( $122 \pm 23$  gün)<sup>32</sup> glukolize olarak kalır.<sup>12,31</sup> Yüksek kan glukoz düzeyleri yüksek HbA1c düzeyi olarak yansır. Normal HbA1c değeri %6' dan düşüktür (Tablo 3). HbA1c düzeyleri diabetik komplikasyon gelişmesiyle korelasyon gösterir.<sup>33</sup>

**Tablo 3:** HbA1c ve ortalama plazma glukoz seviyelerinin korelasyonu <sup>33</sup>

<b>HbA1c (%)</b>	<b>Ortalama Plazma Glukoz Seviyesi (mg/dl)</b>
4	65
5	100
6	135
7	170
8	205
9	240
10	275
11	310
12	345

Diabetin 5 ana komplikasyonu olan mikroanjiopati, nöropati, nefropati, makrovasküler hastalıklar ve gecikmiş yara iyileşmesinin şiddeti ve gelişmesi, belirtilerin ilk görülme zamanı ve diabetin düzeyi gibi pek çok faktöre bağlıdır.<sup>34</sup> Diabetin periodontitis gibi bakteriyel enfeksiyonlar için yüksek risk oluşturduğu bilinmektedir<sup>7,24</sup> hatta periodontal hastalıklar diabetin 6. komplikasyonu olarak kabul edilmektedir.<sup>13,22</sup>

### **Diabetin Periodonsiyum Üzerine Etkisi**

Periodontitis; mikroorganizmalar, inflamatuvar hücreler ve çeşitli sitokinler aracılığıyla, konak cevabı sonucu gelişen bağ dokusu yıkımı, ataşman kaybı, ve marjinal alveoler kemik rezorpsiyonu ile karakterize multifaktöriyel ve kronik seyir gösteren bir hastalık özelliği taşımaktadır.<sup>35,36</sup> Periodontitisli bireylerin dişeti dokularında lenfosit ve makrofajların baskın olduğu yoğun inflamatuvar hücre varlığı gösterilmiştir.<sup>37,38</sup>

Yapılan çalışmalarda diabetin artan gingival inflamasyonla ilişkili olduğu<sup>39,40</sup> ve bir çok bireyde glisemik kontrolün seviyesinin de bakteriyel plağa karşı gingival cevapta önemli rol oynadığı gösterilmiştir.<sup>14,41</sup> Çeşitli çalışmalarda diabetli çocukların sağlıklı çocuklara göre daha şiddetli gingiviteye sahip oldukları,<sup>42,43</sup> T2D' li yetişkinlerde ise

sağlıklı bireylere göre daha fazla gingival inflamasyon görüldüğü ve bu durumun zayıf glisemik kontrollü hastalarda daha da arttığı bildirilmiştir.<sup>44</sup>

Yapılan çalışmalarda diabetik bireylerde yara iyileşmesi geciktiği ve dental plak antijenlerine karşı aşırı monosit cevabı görüldüğü için bu bireylerde periodontal hastalık riskinin arttığı bildirilmiştir.<sup>15,45</sup> Diabetin periodontitis oluşma riskini artırdığını gösteren bir meta analiz çalışması sonucunda, diabetik erişkinlerde diabetik olmayan erişkinlere göre daha şiddetli periodontal hastalık varlığı gösterilmiştir.<sup>40</sup> Üç bin beş yüz' den çok diabetik erişkini içeren bu çalışmalarda periodontitis ve diabet arasındaki ilişki gösterilmektedir.<sup>46</sup>

İki bin yüz kırk dört bireyi kapsayan epidemiyolojik bir çalışmada diabetik bireylerde, non diabetik bireylere göre anlamlı oranda fazla ataşman kaybı saptanmıştır.<sup>40</sup> Ayrıca ataşman kaybının uzun süreli diabeti olan hastalarda daha fazla oranda gözlemlendiği bildirilmiştir.<sup>47</sup>

Diabetik hastalardaki cep derinliği artışlarının sağlıklı bireylere göre daha çok olduğu<sup>48</sup>, buna paralel olarakta diş kayıplarının da daha büyük boyutlarda gerçekleştiği bildirilmiştir.<sup>48,49</sup>

Community periodontal index of treatment needs (CPITN) kullanılarak yapılmış bir çalışmada diabetli hastaların sağlıklı bireylere göre daha fazla periodontal hastalık prevalansına sahip olduğu ve periodontal tedaviye daha fazla ihtiyaç duydukları bildirilmiştir.<sup>50</sup>

Periodontal cep derinliği yüzdesi ve şiddetli ataşman kaybı prevalansının glisemik kontrol kötüleştikçe arttığını destekleyen bir çok çalışma bulunmaktadır.<sup>22,23,21,51,39,41,52</sup> Bu nedenle diabetin metabolik kontrolünün periodontal hastalığın başlangıç ve ilerlemesinde önemli bir faktör olabileceği bildirilmiştir.<sup>5,22</sup>

Diabet dişeti oluğu sıvısı (DOS) 'ndaki glukoz konsantrasyonunu arttırır.<sup>53</sup> DOS' daki yüksek glikoz seviyeleri yara iyileşme kapasitesini direk engelleyebilmektedir. Bu durum periodonsiyumdaki yara iyileşmesi ve doku turnoverında önemli olan fibroblastların ataşmanını engelleyerek ortaya çıkmaktadır.<sup>54</sup> Ayrıca diabette yara iyileşmesinde önemli rol oynayan tükürükteki epidermal büyüme faktörü seviyesinde de azalma gözlenmiştir.<sup>55,56</sup>

DOS sıvısındaki bu değişiklerin plak kompozisyonunu etkileyebileceği düşünölmüş ve yapılan çalışmalarda diabet hastalarındaki gram negatif anaerobik florada artış olduğu gözlenmiştir.<sup>57</sup> Yapılan bazı çalışmalarda diabetli bireylerde daha yüksek oranda Capnocytophaga türleri rapor edilmiş,<sup>47</sup> subgingival plak örneklerinde bulunan Prevotella intermedia (Pi), Wolinella recta (Wr), Porphyromonas gingivalis (Pg)' in T2D' li erişkin bireylerde oluşan periodontitis etyolojisinde önemli rolü olabileceği bildirilmiştir.<sup>58</sup> Buna rağmen bir çok kültür çalışmasında periodontitisli diabetik ve non-diabetik hastalarda subgingival mikroflora benzer bulunmuştur.<sup>14,52,58,59</sup> Potansiyel patojenlerde belirgin farklılık olmaması diabetteki konak immuno-inflamatuar cevap değişiminin periodontal yıkımın prevalansı ve şiddetini arttırdığını düşündürmektedir.<sup>12,59</sup>

Nötrofil ve makrofajları içeren immün hücrelerin fonksiyonları diabette değişiklik göstermektedir.<sup>47</sup> Nötrofil bağlanması<sup>16</sup>, kemotaksisi<sup>17,18</sup> ve fagositozu<sup>19,20</sup> diabetik hastalarda genelde bozulmuştur. Ayrıca gingival sulkuler PMN' lerin fagositik aktivitesinin periferel kan PMN' lerinden daha az olduğu bildirilmiştir.<sup>60</sup> Kan damarlarının bazal membranlarındaki diabete bağlı görölen patolojik kalınlaşmanın da lökosit migrasyonunu azalttığı bildirilmiştir. Nötrofil cevabındaki bu bozulma diabetik bireylerde görölen periodontal hastalık artışının sebeplerinden biri olarak düşünölmektedir.<sup>17,61</sup>

Diabette nötrofil fonksiyonu sıklıkla azalmış olmasına rağmen monosit/makrofaj hücre hattının bakteriyel antijene karşı aşırı cevap gösterebildiği ve bu cevabın proinflamatuvar sitokinler ve mediatörlerin üretiminde belirgin artışla sonuçlandığı bildirilmiştir.<sup>37,38</sup> Pg antijenine cevap olarak diabetik hastalarda non diabetik kontrol grubuna göre periferal kan monositlerinden yüksek seviyede TNF- $\alpha$  üretildiği saptanmıştır.<sup>36</sup> Bu bulgular Pg aşılması yapılmış diabetik hayvan modellerindeki uzun süren inflamatuvar cevapla desteklenmiştir.<sup>37,62</sup> Deneysel Pg enfeksiyonu oluşturulmuş T1D ve T2D' li farelerde uzamış ve yüksek seviyede TNF- $\alpha$  ekspresyonu gözlenmiştir. Bu durum diabetteki inflamatuvar cevabın diabetin tipine değil, hiperglisemiye bağlı olduğunu ortaya koymuştur. Bu uzun, dirençli inflamasyonunda daha fazla matriks yıkımı veya doku tamir kapasitesinin azalması gibi etkileri olabileceği düşünülmüştür.<sup>62</sup> T2D'li bireylerde non-diabetiklere göre periodontal inflame dokularda ve DOS ta, IL-1 $\beta$  ve IL-6 ekspresyonunda artış gözlenmiştir.<sup>63,64</sup> Diabetli bireylerde konak cevabındaki bu değişiklikler periodontal inflamasyon, ataşman kaybı ve kemik kaybının artışı etkilemektedir.<sup>30</sup>

Diabetik hastalarda görülen periodontal ataşman ve kemik kaybındaki artış bağ doku metabolizması değişiklikleri ile de ilişkilendirilmektedir. Hiperglisemiye bağlı kemik iyileşmesi ve kemik turnoverındaki bozulma birçok çalışmada gösterilmiştir.<sup>65</sup> Hiperglisemik durum osteoblastik hücre proliferasyonu ve kolajen üretiminin inhibisyonuna neden olabilir. Bu da azalmış kemik üretimi ve yeni oluşan kemiğin mekanik özelliklerindeki bozulmayla sonuçlanır.<sup>66,67</sup> Çalışmalar diabetli rat ve farelerde periodontal osteoblast ve fibroblastlarda artan hücre ölümü ve dolayısıyla hücre sayılarında azalma olduğunu göstermiştir.<sup>68,69</sup> Böylece proliferasyon ve differansiyasyonda azalma ve hücre ölümlerindeki artışın diabetik hastalarda daha şiddetli periodontal ataşman kaybı görülmesine neden olabileceği bildirilmiştir.<sup>30</sup>

Dejeneratif mikrovasküler değişiklikler periodonsiyumda dahil değişik dokularda görülebilen diabet komplikasyonlarından biridir.<sup>70</sup> Bu değişiklikler anormal büyüme ve damarların bozulmuş rejenerasyonudur. Bu damarsal değişiklikler retina ve glomerulusda görüldüğü gibi periodonsiyumda da görülebilmektedir.<sup>71,48</sup> Dişeti dokularında kapiller bazal membranda kalınlaşma diabetik hayvan ve insan dokularında yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir.<sup>72</sup> Mikroanjyopati, intra ve ekstraselüler kompartman arasında hücrelerin, oksijenin, metabolik ürünler ve diğer moleküllerin değişimini bozabilmekte ve bu nedenle konak cevabı ve doku tamirini etkilemektedir.<sup>73</sup>

Hiperglisemik bireylerde proteinler, glikolize olarak artmış glikasyon son ürünlerini (advanced glycation endproducts(AGE)) oluştururlar.<sup>74</sup> Bu karbonhidrat içeren proteinlerin hücreler arası ve hücre-matriks arasında ilişkileri yönlendiren bir çok etkileri vardır ve genellikle değişik diabetik komplikasyonlar arasında temel bağlantı olduğu düşünülür. AGE üretimi periodonsiyumda da gerçekleşir ve diabet hastalarında diabet hastası olmayanlara göre daha yüksek seviyede periodontal AGE akümüasyonu gözlenmiştir.<sup>75</sup> AGE sıklıkla kolajen üzerinde oluşur ve yüksek stabilitesi olan kolajen makromolekülleri oluşmasına sebep olur. Bu moleküller normal enzimatik bozulma ve doku turnoverına dirençli olduğu için dokularda birikir.<sup>74</sup> Bu kolajenler geniş kan damarı duvarlarında birikerek damar duvarını kalınlaştırır ve lümeni daraltır. Bu vasküler kollajenin düşük yoğunluklu lipoproteine (LDL) afinitesi bulunmaktadır ve LDL' nin damar duvarında birikmesine sebep olarak ateroskleratik değişikliklere neden olur. Bu kolajen makromolekülleri ayrıca endotelial hücrelerin bazal membranında da birirmektedir. Bu da bazal membran kalınlığında artışa neden olarak membran boyunca normal hemostatik geçişi değiştirir.<sup>76</sup> Bu artmış bazal membran kalınlığı diabetli hastalarda periodonsiyumdaki kan damarlarında da görülür.<sup>71</sup> AGE üretimi ayrıca vasküler endotelial büyüme faktör (VEBF) artışı ile ilişkilidir. VEBF

multifonksiyonel bir stokin olup neovaskularizasyon ve diabetin mikrovasküler komplikasyonlarında önemli rol oynar.<sup>41,42</sup> Yükselmiş VEBF, diabetik bireylerin serumunda ve diabetik vaskülopatiden etkilenen tüm temel dokularda saptanmıştır. AGE-kolajen seviyeleri diabetin süresi, diabetik komplikasyonlar ve glisemik kontrol ile korelasyon göstermektedir.<sup>77</sup> İyileşmiş glisemik kontrol azalmış AGE-kolajen üretimi ile ilişkili bulunmuştur.<sup>78,79</sup>

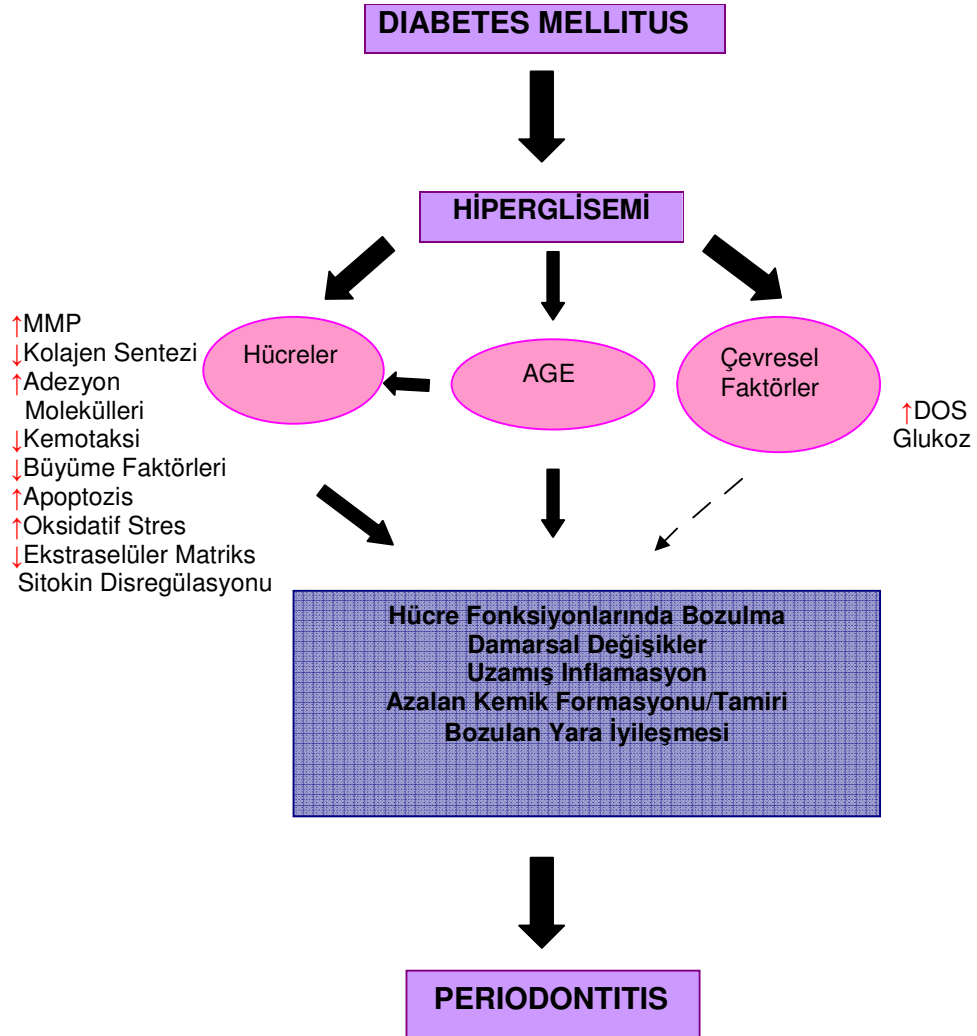
AGE-kemik kolajeninin, kemik metabolizmasındaki hücresel, yapısal ve fonksiyonel özellikleri etkileyebildiği bildirilmiştir.<sup>57,58</sup> Kemik kolajenindeki glikasyon seviyesindeki değişiklikler kemik turnoverını etkileyebildiği ve artmış AGE-kolajen seviyesinin kemik formasyonunu azalttığı bulgulanmıştır.<sup>80</sup> Bu etkinin değişen osteoblastik differansiasyon ve ekstrasellüler matriks üretimi ile de ilgili olduğu bildirilmiştir.<sup>81,82</sup>

AGE, düz kas hücrelerinin, endotelial hücrelerin, nöronların ve monosit/ makrofajların yüzeyinde bulunan reseptörlerini (RAGE) aktive etmektedir.<sup>83</sup> Bu reseptörler periodonsiyumda da bulunur ve T2D' li hastalarda non-diabetik kontrollerle karşılaştırıldığında gingival dokularda RAGE nin mRNA' sının %50 daha fazla olduğu saptanmıştır.<sup>50</sup> Hiperglisemi RAGE ekspresyonunda artma ile sonuçlanmakta ve endoteldeki AGE-RAGE etkileşimi vasküler permabilitede artma ve trombüs oluşumuna neden olmaktadır.<sup>70,83</sup>

Monositlerdeki AGE-RAGE etkileşimi hücresel oksidatif stresi artırır ve nuclear faktör kappa B (NF- κB) transkripsiyon faktörünü aktive eder. Bu da monosit/makrofaj fenotipini değiştirir ve sonuçta IL-1β, IL-6 ve TNF-α gibi proinflamatuvar sitokinlerin oluşumunu artırır.<sup>76,83,84</sup> Endotelial hücreler aşırı geçirgen hale gelir ve adezyon moleküllerinin aşırı ekspresyonu görülür, fibroblastlarda ise azalan kolajen üretimi gözlenir<sup>76,84</sup>. AGE' nin artan akümülyasyonu ile ilişkili olarak yükselmiş

oksidatif stres diabetik hastaların dişeti dokularında da gösterilmiştir.<sup>75</sup> İnflamatuar sitokinler periodontal hastalıkların patogenezinde önemli bir rol oynamaktadır. Glisemik kontrolü zayıf olan diabetli hastalarda DOS IL-1 $\beta$  seviyelerinde artış olduğu ve bu nedenle hipergliseminin artan inflamatuvar cevaba yol açabileceği bildirilmiştir.<sup>64</sup> Diabetik hayvan modellerinde RAGE reseptörlerinin bloke edilmesiyle, dişeti IL-6, TNF- $\alpha$  ve MMP düzeylerinde azalmayla beraber, periodontal dokulardaki AGE akümülyasyonunda ve Pg'e bağlı alveoler kemik kaybında da azalma gözlenmiştir.<sup>85,86</sup>

Kolajen sentezi, olgunlaşması ve hemostatik turnoverındaki değişiklikler diabette sık görülen bulgulardır. Bu değişiklikler periodontal hastalığın patogenezi ve yara iyileşmesindeki değişiklikleri etkilemektedir. Çünkü kolajen periodonsiyumdaki temel yapısal proteindir ve insan dişeti fibroblastı yüksek glikoz içeren çevrede azalmış miktarda kolajen ve glikozaminoglikan üretmektedir.<sup>87</sup> Azalan senteze ek olarak yeni oluşan kolajende, kolajenaz gibi MMP'lerce yıkıma uğratılmaktadır. Bu MMP'ler periodonsiyumu da içeren diabetik bireylerin dokularında yüksek oranda bulunmaktadır.<sup>88,89</sup> Aktif formdaki doku kolajenazı oranının diabetli bireylerde diabetli olmayan bireylere göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.<sup>89</sup> Artmış MMP' nin yeni sentezlenen kolajen üzerine etkisinin tersine AGE tarafından bağlanan kolajende çözünürlük azalır.<sup>89</sup> Kolajen metabolizmasındaki bu değişikliklerin sonucu olarak normal hemostatik kolajen turnoverında değişiklik görülmekte ve böylece son sentezlenen kolajen yükselen aktif MMP seviyeleri ile bozulurken AGE kolajen makromolekülleri dokularda birikmektedir. Hemeostatik dengedeki bu değişiklik periodonsiyumun kronik mikrobiyal zedelenmesine karşı yara iyileşmesi cevabını değiştirmektedir.<sup>12</sup>



Şekil 1: Diabette periodontal hastalık artışının mekanizmaları<sup>90</sup>

### Periodontal Hastalığın Diabetik durum üzerine etkisi

Periodontal hastalıkların diabet üzerine etkisini araştıran çalışmalar ilerlemiş periodontal hastalıkların zayıf glisemik kontrol ve diğer sistemik komplikasyonlarla (kardiovasküler hastalık ve ölüm oranı, proteinüri ve nefropati) ilişkili olduğunu göstermiştir.<sup>91 56-58</sup>

Periodontal hastalığın, diabetin metabolik durumu üzerine belirgin bir etkisinin olduğu saptanmıştır. Periodontitis oranı arttıkça glisemik kontrolde kötüleşme riskide artmaktadır.<sup>12</sup> İki yıllık longitudinal bir çalışmada şiddetli periodontitisi olan diabetik vakalarda periodontitisi olmayan diabetik vakalara kıyasla glisemik kontroldeki kötüleşme riskinin 6 kat arttığı gözlenmiştir.<sup>55</sup> Diabetik bireylere uygulanan periodontal tedavinin glisemik kontrolde iyileşme sağlayabileceğine yönelik çalışmalar bulunmaktadır.<sup>60,92</sup> Kontrol altında olmayan diabetik bireyde yürütülen bir çalışmada peridontal tedavi ve sistemik antibiyotik tedavisinin diabetin kontrolü üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Periodontal tedavi ve 2 hafta süreyle günde 100 mg sistemik doksisisiklin tedavisi uygulanmış grupta, tedavi uygulanmamış kontrol grubuna göre periodontal durumda belirgin oranda iyileşme ve HbA1c değerlerinde de azalma elde edilmiştir.<sup>93</sup> Bununla birlikte periodontitis diabetin diğer komplikasyonlarının görülebilme riskini de arttırabilmektedir. Longitudinal bir vaka kontrol çalışmasında şiddetli periodontitisi olan diabetik bireylerin % 82' sinde major kardiyovaskuler, serebrovaskuler veya periferel vaskuler hastalıkların biri veya daha fazlasının başladığı gözlenirken bu oran periodontitisi olmayan diabetik bireylerde % 21 olarak bulunmuştur.<sup>60</sup>

### **Periodontal Hastalıklarda Sitokinlerin Rolü**

Sitokinler, hücreler arası mesaj alıp verici olarak görev yapan peptid mediatörleri olarak tanımlanmaktadır.<sup>94</sup> Enfeksiyon hastalıklarında, immün yanıtın oluşumunda ve hücreler arası etkileşimde bu çözümler maddelerin önemli bir rolü olduğu bilinmektedir.<sup>95</sup> T lenfositler ve makrofajlar stokinlerin ana kaynağını oluştursalarda konakta meydana gelen birçok fizyolojik olayda önemli rolü bulunan çeşitli hücreler tarafından da üretilirler.

IL-1, geniş biyolojik aktivitelere sahip ve inflamasyon sırasında bazı genlerin ekspresyonunu direkt olarak düzenleyebilen<sup>113</sup> periodontal doku yıkımında ana role sahip<sup>93,94</sup> proinflamatuvar bir sitokindir. IL-1 ailesi 3 üyeden oluşmaktadır: Bunlar IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve IL-1 reseptör antagonisti (IL-1Ra) dir. IL-1 $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  agonist, IL-1Ra ise spesifik reseptör antagonistidir.<sup>113</sup> IL-1Ra, IL-1 $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  tarafından uyarılan hücreler için doğal ve güçlü bir antagonisttir. IL-1Ra, IL-1 $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  yapısal olarak birbirlerine benzerler ve hücreler üzerindeki reseptörlere benzer derecede afiniteye sahiptirler. IL-1 sisteminde antagonistler ve agonistler arasındaki denge inflamatuvar hastalıkların patogenezi üzerinde büyük bir etkiye sahiptir.<sup>96</sup> IL-1reseptör 1 (IL-1R1) ve IL-1reseptör 2 (IL-1R2) olarak adlandırılan 2 adet IL-1 reseptöründe hedef hücre yüzeyinde bulunmuştur.<sup>113</sup> IL-1R1' in genel olarak IL-1' e cevabı düzenlediği düşünülmektedir.<sup>85,86</sup> IL-1R2' nin ise hücrel aktiviteyi düzenlediği ve inflamasyon bölgelerinde hücre yüzeyinden ayrılarak IL-1' in endojenöz inhibitörü olarak görev yapabileceği düşünülmektedir.<sup>97</sup> Düşük sayıda IL-1R1 bir çok hücre tipinde bulunur ve T hücreleri ve fibroblastların üzerindeki predominant tip IL-1 reseptörleridir. IL-1R2 ise genelde nötrofil ve monosit ve B hücreleri üzerinde bulunur.<sup>96</sup>

IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ ' dan daha kuvvetli proinflamatuvar özelliklere sahiptir ve 10-50 kat fazla seviyede üretilir.<sup>98</sup> IL-1  $\beta$  baskın olarak monosit/makrofajlar, polimorfonükleer lökositler tarafından üretilir. Bunun yanında epitel hücreleri, derideki keratinositler, gingival ve dermal fibroblastlar, B lenfositler, osteositler tarafından da üretilir.<sup>99</sup> Mikroorganizmalar, mikrobiyal ürünler, inflamatuvar ajanlar ve antijenler bu sitokinlerin ekspresyonuna sebep olmaktadır.<sup>100</sup> IL-1 $\beta$ ' nin bazı biyolojik etkileri T-lenfosit stimülasyonu ve lenfosit üretimi,<sup>101</sup> B-lenfosit proliferasyonu ve antikör üretimi,<sup>102</sup> fibroblast proliferasyonu, monosit ve fibroblastlardan PGE<sub>2</sub> üretiminin stimülasyonu, ekstraselüler matriks proteinlerinin yıkımına neden olan MMP salınması<sup>103</sup> ve MMP üretimini azalacak şekilde

düzenlenmesidir.<sup>5,104</sup> IL-1 $\beta$  ayrıca osteoklast formasyonu ve kemik rezopsiyonuna katkıda bulunmakta, nötrofil kemotaksisi - aktivasyonunu ve endotel hücre fonksiyonunu etkilemektedir<sup>105,106</sup>.

Yapılan çalışmalarda periodontal hastalıklarda DOS<sup>130,131</sup> ve periodontal dokularda IL-1 $\beta$  seviyesinin arttığı<sup>132,133</sup> ve hastalık şiddeti ile IL-1 $\beta$  seviyesi arasında da korelasyon olduğu tespit edilmiştir.<sup>107,108</sup>

### **Matriks Metalloproteinazlar (MMP)**

MMP' lar, Zn<sup>+2</sup> bağımlı proteolitik enzim ailesi olup hücre plazma membranındaki veya ekstraselüler matriks içindeki proteinlerin (kolajen, jelatin, proteoglikan core protein, fibronektin, laminin ve elastin) bozulmasını katalize ederler.<sup>136,137</sup> MMP' lar romatoid artrit, osteoartrit, otoimmün ulseratif deri lezyonları ve tümör hücresi invazyonu ve metastazı gibi çeşitli patolojik durumlarda ekstraselüler matriksin yıkımından primer sorumludur.<sup>109</sup> MMP' lar ayrıca periodontitiste anahtar rol oynar ve insan periodontal dokularındaki fibroblast, keratinosit, makrofaj, PMN, endotelial hücreler, osteoblastlar ve osteoklastlar gibi major hücre tiplerince üretilir. Sağlıklı dokularda periodontal bağ dokusunun idamesini sağlayan MMP' lar primer olarak fibroblastlar tarafından üretilir (MMP-1 veya kolajenaz-1). İnflame dokularda sağlıklı dokulara göre MMP ekspresyonu değişir çünkü periodonsiyumdaki major hücre tiplerinin her biri, uyarıldığında farklı MMP' ları eksprese eder.<sup>111,117</sup> Periodontal hastalığın gelişiminde önemli olan proinflamatuvar mediatörler (IL-1  $\alpha$ , IL-1  $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) MMP geninin transkripsiyonunu arttıracak şekilde düzenlerler.<sup>112</sup>

MMP'lar inaktif (latent) formda salgılanırlar ve dokulardaki enzim aktivitesi; kısmen latent enzim aktivasyonu ve enzim inhibitörlerinin seviyesinin varlığı ile kontrol edilir. MMP' ların aktivasyonu için latent

enzimlerin bir kısmında proteolitik ayrılma gereklidir. MMP' ları aktive eden proteazlar; bakteriyel enzim kökenli proteazlar (örn : T denticola tarafından üretilen) ve nötrofil katepsin G gibi konak hücre enzimleridir.

MMP aktivitesinin düzenlenmesi, bir çok hücre tipinden üretilen ve konak doku / sıvılarında sıklıkla bulunan MMP' nin spesifik endojen doku inhibitörleri (MMDI) ve aktif MMP ile kompleks oluşturan ve serumda / DOS' da bulunan  $\alpha$ -makroglobülinler ve bazı vakalarda latent MMP prekürsörleri ile gerçekleşmektedir.<sup>4,110, 111</sup>

MMDI' ler fibroblastlar, keratinositler, makrofajlar ve endotelial hücreler gibi çeşitli hücre tiplerinden üretilir ve vucut sıvılarına ve dokulara dağılır.<sup>109</sup> MMDI' lerin 4 üyesi rapor edilmiştir. Bunlardan MMDI-1 ve MMDI-2' nin periodontal lezyonlarda bulunan tüm MMP' ler üzerine inhibitör etkisi bulunmaktadır.<sup>115</sup> MMDI-2, PMN kaynaklı MMP' lere, MMDI-1 ise fibroblast kaynaklı MMP' lere karşı kuvvetli inhibisyon göstermektedir.<sup>103</sup>

İnflame periodontal dokularda MMP tip ve miktarındaki patolojik değişikliklerin sonucu olarak MMP ve MMDI arasındaki denge bozulmuştur. Bu durum ekstraselüler kolajenin parçalanmasına neden olarak periodontal dokuların yıkımına önderlik eder.

Periodontitisli hastaların DOS örneklerindeki predominant MMP' ların PMN kaynaklı (özellikle MMP-8, MMP-9) olduğu bildirilmiştir.<sup>112,113</sup> Bu MMP' lar özellikle dişeti ve periodontal ligamentteki predominant kolajen tipi olan tip-1 kolajenin parçalanmasında etkilidir.<sup>114</sup> Bu nedenle inflame dişeti ve periodontal dokularda görülen predominant MMP' lar, fibroblast tip MMP (MMP-1) den ziyade PMN tipi MMP' lar (MMP-8 ve MMP-9) ve kemik kaynaklı MMP-13' dür.<sup>121</sup> PMN tip MMP' ların

seviyesinin, periodontal hastalık şiddetiyle artış gösterdiği ve tedaviyi takibinde azaldığı bildirilmiştir.<sup>113,115</sup> .

MMP' lar ayrıca kemik rezorpsiyonunu da kolaylaştırırlar ve bunu mineralize olmamış osteoidi ve kolajen matriksi (osteoklastlarca kemiğin demineralizasyonundan sonra kalan) degrade ederek yaparlar. Bu nedenle periodontal yumuşak ve sert dokulardaki kolajen liflerin MMP'lerce yıkımı ile birlikte IL-1  $\beta$  gibi proresorptif sitokinler tarafından arttırılan osteoklast kaynaklı kemik rezorpsiyonu, periodontitisteki cep oluşumu, ataşman kaybı, kemik rezorpsiyonu, dişeti çekilmesi, diş mobilitesi ve diş kaybı gibi objektif bulguların şiddetinde artışa neden olur.<sup>3</sup>

Yeni üyelerinin katılımı ile birlikte bu enzim ailesinin bugüne kadar tanımlanmış 66' dan fazla üyesi bulunmaktadır. Bunlardan 23' ünün insanlarda sentez edildiği gösterilmiştir.<sup>116</sup> MMP'lar, kolajenazlar, jelatinazlar, stromelizinler, membran tip MMP' lar ve diğerleri olmak üzere 5 alt grupta sınıflandırılabilir.<sup>117</sup>

**Tablo 4:** MMP enzimlerinin sınıflandırılması<sup>118</sup>

Grup Adı	Tanımlayıcı İsim	Numara	Temel Substrat
<b>Kolajenazlar</b>	İnterstisyel kolajenaz	MMP-1	Kolajen Tip 1, 2, 3, 7 ve 10, jelatin, PG
	Nötrofil kolajenaz	MMP-8	Kolajen Tip 1, 2, 3, PG
	Kolajenaz 3	MMP-13	Kolajen Tip 1, 2, 3
	Kolajenaz 4	MMP-18	Kolajen 1
<b>Jelatinazlar</b>	Jelatinaz A	MMP-2	Jelatin, Kolajen IV, V, VII ,X, XI, elastin
	Jelatinaz B	MMP-9	Jelatin, Kolajen IV, V, XIV, elastin, PG
<b>Stromelisinler</b>	Stromelizin 1	MMP-3	PG, laminin, FN, jelatin, kolajen III, IV, IX ve X
	Stromelizin 2	MMP-10	PG, laminin, FN, jelatin, kolajen III, IV, IX ve X
	Stromelizin 3	MMP-11	PG, laminin, elastin, entaktin, tenaskin, versikan, jelatin, kolajen III, IV, IX, X
<b>Membran Tipi MMP'ler (MT-MMP'ler)</b>	MT1-MMP	MMP-14	Kolajen,I, II, III, FN, laminin, VN
	MT2-MMP	MMP-15	
	MT3-MMP	MMP-16	Agrekan, FN, laminin, tenaskin
	MT4-MMP	MMP-17	
	MT5-MMP	MMP-24	Kolajen III, FN, jelatin
	MT6-MMP	MMP-25	
<b>Diğerleri</b>	Matrisilin 1	MMP-7	Serin Proteaz inhibitörleri
	Metaloelastaz	MMP-12	
	RASI-1	MMP-19	Kolajen I, IV, elastin, FN, jelatin, laminin, VN
	Enamelisin	MMP-20	Kolajen IV, entaktin, FN, jelatin, laminin, tenaskin
	X-MMP	MMP-21	
	CA-MMP	MMP-23	Agrekan,amelogenin
	Matrisilin 2	MMP-26	Tanımlanmamıştır
	CMMP	MMP-27	Tanımlanmamıştır
	Epilisin	MMP-28	Tanımlanmamıştır

PG: Proteoglikan, FN: Fibronektin, VN: Vitronektin.

Jelatinazlar Jelatinaz A (MMP-2) ve Jelatinaz B (MMP-9) olmak üzere ikiye ayrılır. Molekül ağırlığı 72 kDa olan MMP-2 MMDI-2 tarafından, molekül ağırlığı 92 kDa olan MMP-9 ise MMDI-1 tarafından inhibe edilmektedir. MMP' lar arasında jelatinazlar (MMP-2 ve MMP-9), tip IV kolajen, laminin ve diğer bazal membran komponentlerini parçalayarak tümör invazyonu ve metastazına katkıda buldukları için özellikle çalışmalarda araştırılmıştır.<sup>150,151</sup>

Çalışmalar diabetik bireylerde MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonunun arttığını göstermiştir.<sup>153,154</sup> Diabetin ayrıca yara iyileşmesinde önemli olan MMP ve inhibitörleri arasındaki dengeyi bozduğu bildirilmiştir. Aşırı proteolizisin, ciltte görülen ülserlerdeki yara iyileşmesi gecikmesine<sup>119</sup> ve diabetik hastalarda daha derin periodontal cep görülmesine ve ataşman kaybına neden olabileceği düşünülmektedir.<sup>120</sup>

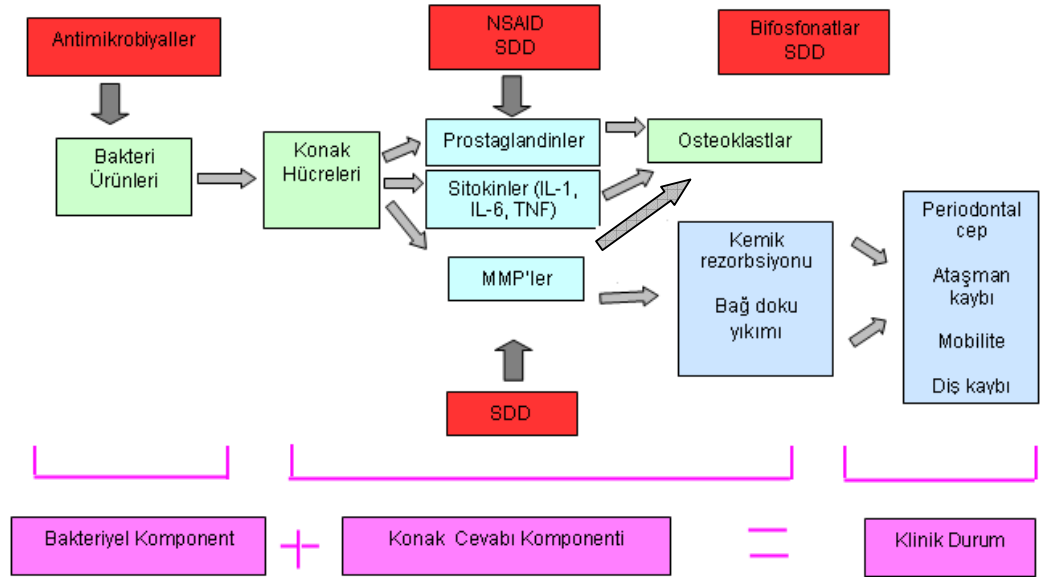
MMP-9, insülin degradasyonuna izin veren bir faktördür. Yüksek glukoz seviyeleri lökositlerden salgılanan latent MMP-9' un aktivasyonuna katkıda bulunur. Ayrıca MMP-9'un T hücrelerinin proliferasyonunu da arttırdığı düşünülmektedir.<sup>153</sup>

Ratlarda ve insanlarda yapılan çalışmalarda periodontal hastalık durumunda MMP-2 ve MMP-9'un predominant formları tanımlanmış ve bu MMP'lerin periodontal hastalığın şiddeti ile ve inflamatuvar cevabın ve hücrel migrasyonun düzenlenmesiyle de ilişkili oldukları bildirilmiştir.<sup>121-124</sup> MMP-2 özellikle makrofajlardan ve çok çekirdekli hücrelerden eksprese olduğundan ekstraselüler matriksin degradasyonunda önemli rol oynamaktadır<sup>125</sup>. MMP-9 özellikle osteoklastlardan eksprese olur ve kemik matriksindeki kolajeni ve ilişkili proteinleri degrade eder.<sup>126</sup> MMP- 2' yide içeren bir çok MMP sağlıklı dokulardaki hücrelerden de üretilirken, MMP-9 sınırlı sayıda hücreden büyüme faktörleri ve sitokinlere cevap olarak salgılanır.<sup>127</sup> Bu da periodontal hastalık gelişimi için önemli bir inflamatuvar mediatör olabileceğini göstermektedir.<sup>128</sup>

## Konak Modifikasyon Tedavisi (KMT)

Periodontitiste yumuşak ve sert doku komponentlerinin yıkımı konak immüno-inflamatuar savunma mekanizmasının bakteriyel plağa karşı cevabı olarak kabul edilmektedir.<sup>10</sup>

KMT, doku yıkımını azaltan ve stabilize eden veya konak cevabının yıkıcı yönlerini azaltacak şekilde düzenleyerek periodonsiyum rejenerasyonuna yardımcı olan ve protektif veya rejeneratif cevabı arttırmayı amaçlayan bir tedavi yöntemidir. Değişik ilaç grupları konak modifiye edici ajan olarak kullanılmaktadır. Bunlar; non steroidal antiinflamatuvar ilaçlar, bifosfonatlar ve tetrasiklinlerdir.<sup>4</sup> (Şekil 3)

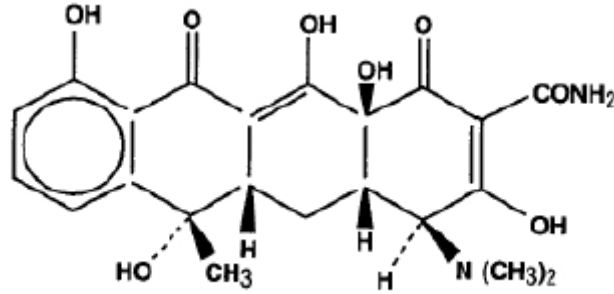


Şekil 2: KMT 'nin etki mekanizması<sup>4</sup>

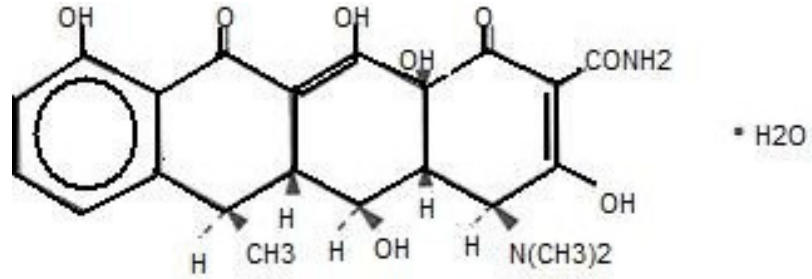
## Tetrasiklinler

Tetrasiklinler yapıca birbirine çok yakından benzeyen ve bir tetrasiklik bileşik olan naftasenkarboksamid' den türeyen geniş spektrumlu antibiyotiklerdir.<sup>129</sup> İlk tetrasiklin antibiyotiği 1948 yılında *Streptomyces aureofaciens*' ten elde edilen klortetrasiklidir. Daha sonra oksitetrasiklin, tetrasiklin, dimetilklortetrasiklin adlı diğer doğal tetrasiklinler tedavi amaçlı kullanıma girmişlerdir.<sup>129</sup> Bunları yarı sentetik tetrasiklinler olan metasiklin, doksisisiklin ve minosiklin izlemiştir. Tetrasiklinler bakteri ribozomlarında protein sentezini inhibe etmek suretiyle bakteriyostatik etki oluştururlar. Bakteri hücresi içine, hücre dışı duvarındaki porin kanallarından geçmek ve sitoplazma membranındaki aktif transport mekanizması tarafından hücre içine pompalanmak suretiyle girerler. Bakteri hücresi içine girdikten sonra ribozomların 30S alt-birimine bağlanırlar ve bunun sonucu 50S alt-biriminin akseptör noktasına (A noktasına) aminoasil transfer RNA' nın bağlanmasını bloke ederler ve peptid zincirine amino asid eklenmesini olanaksız duruma getirirler.<sup>129</sup>

Tetrasiklinler DOS' da serum seviyelerine göre daha yüksek miktarlarda bulunmaktadır<sup>130</sup> ve periodontal hastalıklardan sorumlu tutulan gram (-) organizmaların kontrolünde etkilidirler.<sup>131,132</sup> Sistemik antibiyotik kullanımlarına ek olarak diş yüzeyine bağlanma ve yavaş salınım özelliklerine bağlı olarak tetrasiklinler kök yüzeyi modifikasyonlarında ve lokal salınım ajanı olarak da kullanılmaktadırlar.<sup>133,134</sup>



Şekil 3:Tetrasiklinin kimyasal yapısı ( $C_{22}H_{24}N_2O_8$ ) (bilgi ağı ortamından alınmıştır)



Şekil 4: Doksisiklinin kimyasal yapısı( $C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot H_2O$ ) (bilgi ağı ortamından alınmıştır)

Son yıllarda yapılan araştırmalarda tetrasiklinlerin MMP aktivitesini azaltacak bir özelliğe sahip olduğu anlaşılmıştır. Tetrasiklin ailesinin tüm üyelerinde bulunan bu özellik ilk olarak 1980'lerin başlarında, diabet üzerine yapılan çalışmalar sırasında saptanmıştır. Diabetik ratların dişetinde anormal düzeyde yükselmiş kolajenaz aktivitesi belirlenmiş<sup>135</sup> ve ilk olarak bu durumun dişeti oluştuktaki mikroflora değişiminin sonucu olabileceği hipotezinde bulunulmuştur.<sup>136</sup> Bu sebeple diabetik ratlara minosiklin uygulanarak mikrofloranın inhibe edilmesiyle kolajenaz seviyesinde azalma sağlanması hedeflenmiştir.<sup>136</sup> Bu çalışmanın sonucunda minosiklin tedavisi germ-free diabetik ratlarda

gingival kolajenaz seviyelerini baskılamasının yanında bu özellik ilacın mikrobiyal flora üzerine etkisiyle ilgili bulunmamıştır. Minosiklinin ayrıca in vitro olarak PMN kolajenaz aktivitesini inhibe ettiği ve diabetik ratlarda alveolar kemik kaybınıda yavaşlattığı gösterilmiştir.<sup>136</sup> Tetrasiklinin antimikrobiyal ve antibiyotik özelliklerinden ayrı olarak kolajenolitik aktiviteyi engelleyen bir özelliğe sahip olduğunu gösteren bu sonuç, devam eden çalışmalarda da doğrulanmıştır.<sup>137,138</sup> Yapılan çalışmalarda minosiklin, doksisisiklin ve tetrasiklinin kolajenolitik aktiviteyi inhibe ettiği gösterilmiş iken tetrasiklin grubu dışındaki antibiyotiklerin bu etkiye sahip olmadığı bulunmuştur.<sup>137</sup>

Tetrasiklinlerle yapılan ilk çalışmalarda ilacın sistemik olarak kullanılmasının köpeklerde cep epitelindeki nötrofil ve makrofaj sayısını belirgin oranda düşürdüğü<sup>139</sup> ve alveoler kemik kaybında azalma elde edildiği bildirilmiştir.<sup>140</sup>

Tetrasiklinler kolajenolitik aktiviteyi birçok sinerjistik mekanizmayla azaltmaktadır. Tetrasiklinler aktif MMP' yi kalsiyum ve çinko bağlama özelliğine bağlı olarak direkt bir mekanizmayla engellemektedir.<sup>138,141</sup> Ek olarak tetrasiklinler, PMNL–kaynaklı reaktif oksijen metabolitlerinin (hipokloröz asit (HOCl)) üretimini engellemektedir.<sup>142</sup> Bu özellik, latent pro- MMP' yi aktive eden HOCl' yi inhibe ederek, doksisisiklinin non-antimikrobiyal, anti-inflamatuar özelliklerine katkıda bulunabilir.<sup>83,84</sup> Ayrıca HOCl , konak kaynaklı proteinaz inhibitörleri  $\alpha_1$ -PI ve  $\alpha_2$  –makroglobulin (MMP inhibitörleri) oksidize eder ve inaktive eder.<sup>143</sup>  $\alpha_1$ -PI, doku yıkıcı enzimleri özellikle serum proteinazları inhibe eden majör bir endojen inhibitördür.<sup>144</sup> İltihabi hastalıklarda, reaktif oksijen türleri ve kolajenaz tarafından  $\alpha_1$ -PI inaktive edilir.<sup>145</sup> Böylece tetrasiklin, MMP aktivitesinin direkt inhibisyonu ve HOCl gibi reaktif oksijen metabolitlerinin inhibisyonu ile periodontitiste görülen bağ doku yıkımının düzenlenmesinde önemli bir yol oluşturur.

MMP'lerin tetrasiklinlerle inhibisyonuna ait diğer mekanizmalarda tanımlanmıştır. Tetrasiklinler osteoblast ve osteoklast kaynaklı MMP'yi inhibe ederek, kemik rezorpsiyonunu engelleyebilmektedir.<sup>146</sup> Tetrasiklinler ayrıca pro-inflamatuar mediatörlerin ve sitokinlerin (IL-1 ve TNF- alfa) ekspresyonunu azaltarak<sup>87 147,148</sup> ve kolajen üretimini, osteoblast aktivitesini ve kemik üretimini artırarak bağ doku yıkımının azalmasına da katkıda bulunur.<sup>141</sup>

Nitrik oksit düz kas relaksasyonu, nörotransmisyon, doku yıkımı ve iltihabi olaylara katılımdan sorumlu sayısız işlevleri olan mesajcı bir moleküldür. Yapılan çalışmalarda, minosiklin ve doksisisiklinin insan osteoartritlik kıkırdak örneklerindeki nitrik oksit sentetaz aktivasyonunu bloke ettiği ve mürin makrofajlarında endotoksinle uyarılmış nitrik oksit sentetazı inhibe ettiği gösterilmiştir<sup>149</sup>. Fosfolipaz A<sub>2</sub>, araşidonik asit şelalesinin erken fazlarına katılan bir enzimdir ve doku sıvılarındaki düzeyleri bağ dokusu yıkımı ile ilişkilidir. Minosiklin ve doksisisiklinin fosfolipaz A<sub>2</sub>'yi inhibe ederek araşidonik asit metabolizmasında etkili olabileceği ifade edilmiştir.<sup>150</sup>. 1994'te Webster ve arkadaşları<sup>151</sup> tetrasiklinlerin proteinkinaz C'yi inhibe edebildiğini belirtmiştir. Proteinkinaz C, stromelizin ve kolajenaz gibi çeşitli MMP'lerin transkripsiyonel aktivasyonuna aracılık etmektedir.

Tetrasiklinlerin bağ dokusu yıkım inhibisyonu özetlenecek olursa<sup>141</sup>:

1. Hücre dışı mekanizmalara aracılık ederek;
  - Tetrasiklinler Ca ve Zn 'ya bağlanma özellikleri sonucu aktif MMP'ların doğrudan inhibisyonunu sağlar.
  - Pro-MMP'ların oksidatif aktivasyonunun inhibisyonunu sağlar.
  - MMP'ların inhibisyonu  $\alpha$ 1-proteinaz inhibitörü ( $\alpha$ 1-PI) korur
2. Hücresel mekanizmalara aracılık ederek;

- Sitokinler, indüklenbilir nitrik oksit sentetaz, fosfolipaz A<sub>2</sub>, prostoglandin (PG) sentezlerini azaltır.
  - Proteinkinaz C ve Calmodulin'e etki eder.
3. Proanabolik etkilere aracılık ederek;
- Kolajen yapımını artırır.
  - Osteoblast aktivasyonunu ve kemik oluşumunu artırır.

Tetrasiklinlerin diabetik ratlarda kolajen formasyonunu normalize ettiği ve kolajenazlar gibi MMP'lerin üretimini azalttığı gösterilmiştir.<sup>88,89</sup> Şiddetli periodontitisi olan T1D ve T2D' li bireylerde detertraj ve kök yüzeyi düzleştirilmesi ile beraber sistemik doksisisiklin tedavisini takiben glisemik kontrolde düzelme olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmalarda periodontal tedavilerle ilişkili olarak HbA1c seviyelerinde tedavi öncesi değerle tedavi sonrası 2-3. aylarda yaklaşık % 10 azalma bildirilmiştir.<sup>68</sup>

#### Kimyasal Olarak Modifiye Tetrasiklinler (KOMT)

Tetrasiklin molekülündeki belli bölgelerin anti-MMP aktivitesinden sorumlu olduğu düşünülerek 1987'de ilk olarak tetrasiklinin antimikrobiyal aktivitesi için gerekli olan C4-dimetil amino grubu kaldırılarak KOMT tanımlanmıştır. Bu tetrasiklinler KOMT-1 olarak adlandırılmıştır. KOMT-1'de antimikrobiyal özellik kaybolmuş fakat hem in vivo hem de in vitro çalışmalarda antikolajenaz özelliği gösterilmiştir.<sup>152</sup> Günümüzde KOMT-1 ve KOMT-10 arasında farklı yan zincirler kaldırılarak veya eklenerek 10 çeşit antimikrobiyal olmayan KOMT tanımlanmıştır.<sup>25,153</sup> On bileşiğin dokuzunda antibakteriyel olmayan MMP inhibitörleri bulunmaktadır. Sadece KOMT-5'de MMP inhibisyonu kaybolmuştur.<sup>25</sup> On çeşit KOMT arasından KOMT-1,-3,-6,-7,-8 hücre kültüründeki kemik

erimesinde etkili inhibitörler olarak gösterilmiştir. En güçlü bileşik KOMT-8 olarak bildirilmiştir.<sup>25,153-156</sup>

### Subantimikrobiyal Doz Doksisisiklin (SDD)

Doksisisiklinin, tetrasiklinler arasında en güçlü anti-kolajenaz özelliğe sahip olduğu anlaşıldıktan sonra araştırmalar doksisisiklin üzerine odaklanmıştır.<sup>25,157</sup> Araştırmacılar, doksisisiklinin diğer tetrasiklin grubu ilaçlardan daha sıkı bir şekilde  $Zn^{+2}$  'ya bağlandığını bildirmişlerdir.<sup>25</sup> Ayrıca doksisisiklinin inhibe edici konsantrasyonu ( $IC_{50}=15\mu$ ), minosiklinden ( $IC_{50}=190\mu$ ) veya tetrasiklinden ( $IC_{50}=350\mu$ ) daha düşüktür<sup>157</sup> ve doksisisiklinin PMN tip kolajenaz aktivitesini (MMP-8) engellemede, fibroblast tip kolajenaz aktivitesine (MMP-1) göre daha etkili olduğu anlaşılmıştır. Bu durum doksisisiklinin, normal bağ doku turnoverına müdahale etmeden patolojik olarak yükselmiş kolajenaz seviyelerini azalttığını ve daha güvenli bir tedavi metodu olduğunu göstermiştir.<sup>113</sup>

1990 yılında, Golub ve arkadaşları konu ile ilgili yaptıkları ilk deneysel çalışmada, günde iki kez 20 mg alınan SDD'nin, kronik periodontitisli hastaların dişeti dokuları ve DOS' daki kolajenolitik aktiviteyi iki hafta gibi kısa bir süre içerisinde %60-80 oranında azalttığını ileri sürmüşlerdir.<sup>158</sup> Aynı araştırmacıların yaptığı diğer bir çalışmada ise 1-3 aylık süre ile SDD kullanıldığında doksisisikline dirençli mikroorganizmalar ve diğer antibiyotik yan etkileri oluşturmaksızın periodontitisin ilerlemesinin önlenildiği gösterilmiştir<sup>159</sup>. Bu çalışmadan sonra periodontal hastalığın tedavisinde SDD kullanımının yararı ile ilgili bir dizi çalışma daha yapılmıştır. Deneysel periodontitis oluşturulmuş ratlarda yapılan çalışmalarda SDD uygulamasının, aveoler kemik kaybında, mononükleer hücre akümülyasyonunda ve oseoklast sayısında azalma gözlenmiştir.<sup>160</sup> SDD kullanımı sonucunda erişkin periodontitisli bireylerde DOS kolajenaz aktivasyonunda azalma, ataşman seviyesinde kazanç<sup>161</sup>, cep derinliğinde

belirgin azalma sağlanmıştır.<sup>162</sup> Yapılan çalışmalar SDD + kök yüzeyi düzeltmesi ve kazınması (KDK) tedavisinin periodontal hastalığın tedavisinde etkin bir tedavi seçeneği olduğunu göstermektedir.<sup>161-165</sup>

Günümüze kadar periodontal hastalık tedavisinde sistemik olarak kullanılmak üzere FDA (Food and Drug Administration) tarafından onaylanmış konak modifikasyon ajanı, MMP aktivitesini azaltacak şekilde düzenleyen SDD (Periostat<sup>®</sup>, Colla-Genex Pharmaceuticals Inc., Newtown, PA,USA) dir.<sup>3</sup>

Antibiyotik dozunda doksisisiklinin ( $\geq 100\text{mg}$ ) yan etkileri fotosensitivite, hipersensitivite reaksiyonları, bulantı, kusma ve özefagal iritasyondur. Bugün periodontitise yardımcı tedavi olarak kullanılabilen SDD dozu 20 mg'lık preparatlar halindedir.<sup>3</sup> Yapılan klinik çalışmalarda subantimikrobiyal doz doksisisiklin (20 mg günde 2 kez) kullanımı sonucu tetrasiklin sınıfı antibiyotiklerin tipik yan etkileri gözlenmemiştir.<sup>166</sup> Ayrıca antimikrobiyal etki ile ilgili bir yan etkide bildirilmemiştir.<sup>3,167</sup> SDD vucutta iyi tolere edilir ve en sık rastlanılan yan etkileri baş ağrısı, grip hastalığı semptomları, soğuk algınlığı olarak bildirilmesine rağmen bu yan etkiler açısından plasebo kullandırılan gruplarla fark bulunamamıştır.<sup>166</sup> SDD kullanımı sonucu normal periodontal florada değişiklik gözlenmemiş, fırsatçı patojenlerde kolonizasyon veya artış saptanmamış ve periodontal ceplerde doksisisikline karşı dirençli mikroorganizma gelişimi de bulgulanmamıştır<sup>166,168</sup>. SDD'nin gastrointestinal ve ürogenital bölgelerdeki mikrofloraya belirgin etkileri bulunmamış, fırsatçı patojenlerde artışa sebep olmamıştır.<sup>166</sup>

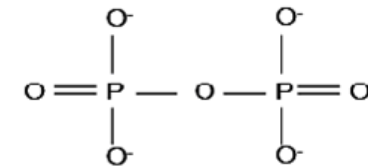
### **Bifosfonatlar**

Bifosfonatlar (BF) osteoporozun önlenmesi ve tedavisinde etkili, tedavi edici ajanlardır<sup>10</sup>. Klinikte paget hastalığı, tümörle ilişkili

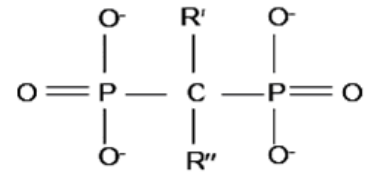
kemik hastalığı gibi kemik yıkımının arttığı durumlarda kullanılmaktadır. Ayrıca ektopik kalsifikasyonlu ve kemikleşmeli (osifikasyonlu) hastalıklara sahip hastalarda kalsifikasyon inhibitörü olarak da kullanılırlar.<sup>129,169</sup>

Günümüzde kullanılan kemik rezorpsiyon inhibitörlerinden biri olan BF' in yapısı pirofosfata (PF) benzerdir. PF' lar insan metabolizmasının normal bir ürünü olup serum ve ürinde bulunur ve kalsiyum-şelat özelliklerine sahiptir.<sup>170,171</sup> BF'lar, inorganik PF' ın P-O-P grubu yerine, P-C-P grubu içeren ve bu gruptaki karbon atomu üzerinden sübstitüe edilmiş organik analoglarıdır. İki C-P bağı aynı karbon üzerinde olduğu için bu bileşiklere geminal (ikiz) bifosfonatlar adı da verilmektedir.<sup>170,172</sup>

PF, in vivo olarak çok kararlı bir molekül değildir ve pirofosfataz ve alkaline fosfataz aktivitesinin sonucu olarak kararsız P-O-P bağı hızlıca hidrolize olur.<sup>173</sup> BF' lar enzimatik hidrolize (alkaline fosfataz ve pirofosfataz) tamamen dayanıklıdır ve kimyasal olarak oldukça kararlıdır. BF' ların, PF' lar gibi hidroksiapatit (HA) moleküllerine yüksek afiniteleri vardır ve kristal oluşumunu, çözünmelerini inhibe ederler ve kemik mineraline kuvvetli şekilde bağlanırlar.



pirofosfat



bifosfonat

**Şekil 5: Bifosfonat ve pirofosfatın kimyasal yapısı<sup>174</sup>**

Farklı BF' lar P-C-P yapısındaki karbon atomundaki 2 kenar zincirlerin değiştirilmesi ile (R' ve R'') oluşturulmuşlardır.<sup>172</sup> Kemik mineraline bağlanma R1 deki hidroksil grubunun varlığıyla arttırılmıştır. R2 yapısı ve 3 boyutlu yapı BF' ın hücresel etkilerini ve kemik rezorpsiyonuna etkisini belirler. Kenar zincirlerin değişimi her BF' ın kimyasal, fizikokimyasal ve biyolojik karakterlerinde değişik varyasyonlara sebep olur.<sup>172</sup> Her BF' ın kenar zinciri ile tanımlanan kendi aktivite profili vardır. Birinci jenerasyon BF' larda (etidronat, klodronat) alkil, ikinci jenerasyon BF' larda (tiludronat, alendronat ve pamidronat) amino, üçüncü jenerasyon BF' larda (risedronat, ibandronat, zoledronat) siklik kenar zinciri bulunmaktadır.<sup>174</sup>

Yapılan çalışmalarda BF' ların osteoklastlar üzerine direkt etkilerinin olduğu tespit edilmiştir. BF'ların osteoklast prekürsörlerinin toplanmalarını ve proliferasyonlarını azaltma ve osteoklast apoptozisine sebep olduğu bildirilmiştir. Kemik turnoverı sırasında, matrikse bağlanan BF' lar osteoklastlar tarafından fagosite edilir ve osteoklastların içindeki BF akümüasyonu, osteoklastların şeklini değiştirir ve tırtıllı kenarın (ruffled border) bozulmasına yol açarak apoptozisine neden olur.<sup>175</sup> BF' ın üç boyutlu yapısı kalsiyum gibi çift değerli metal iyonlarının şelasyonuna izin verir bu da BF' ın hızlıca dolaşımdan aktif kemik remodelingi sağlanan hedef hidroksil apatit bölgesine geçişini sağlar.<sup>176</sup> Matrikse bağlanan BF' lar, osteoklastların altındaki resorptif lakünelardaki pH azalınca serbest hale gelir.<sup>176</sup>

BF' lar kimyasal özellikleri ve moleküler etki mekanizmalarına göre nitrojen içerenler ve içermeyenler olarak 2 genel gruba ayrılabilir.<sup>78,79</sup> Nitrojen içermeyen, klodronat, etidronat ve tiludronat gibi basit BF' lar PF' lara benzer ve nonhidrolize ATP (adenozin trifosfat) anolagları gibi osteoklastlarda hücre içine akümüle olur ve çok sayıda intraselüler metabolik enzimi inhibe ederek apoptozise neden olurlar.<sup>176</sup>

Osteoklastlarla birleşen basit BF' lar, adenzin monofosfat (AMP) ile kondensasyona uğrar ve bu kondensasyon reaksiyonundan oluşan metabolitler hücre içine akümüle olur. Intraseluler enzimlerin inhibisyonunu takiben hücre fonksiyonlar bozulur ve kümülatif hücre sitotoksitesi, osteoklast apoptozisine sebep olarak kemik rezorpsiyonunu inhibe eder.<sup>176</sup>

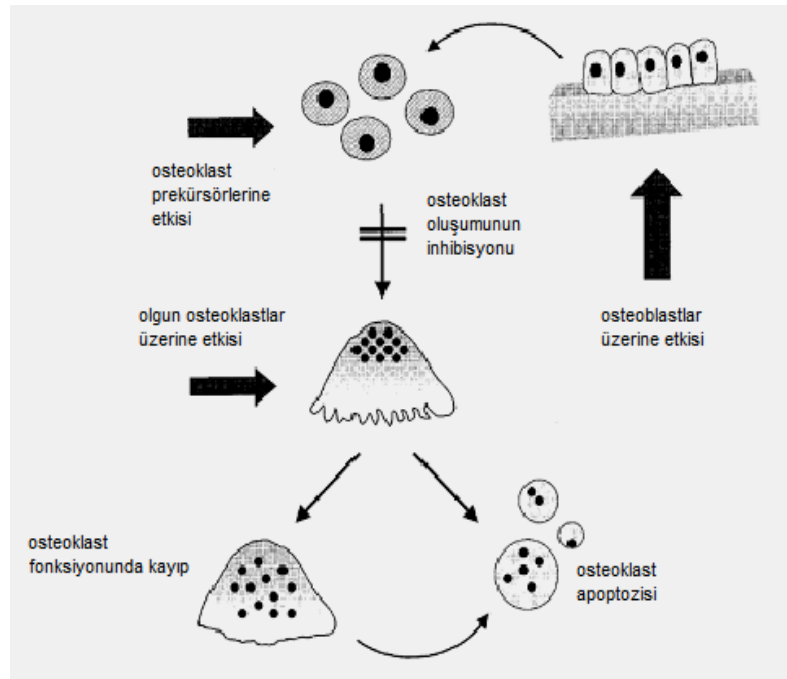
Pamidronat, risedronat, zoledronat ve alendronat gibi nitrojen içeren BF' lar (N-BP), kolestrol biyosentezindeki mevalonat yolunu inhibe ederler. Osteoklast apoptozisine neden olurlar ve böylece basit BF' lardan farklı bir yolla kemik rezorpsiyonunu inhibe ederler.<sup>176</sup> N-BF' lar özellikle mavelonat yolundaki geranillpirofosfatın, farnesilpirofosfata dönüşümünü katalize eden farnesilpirofosfataz sentezini inhibe ederler. Bu durum hücre fonksiyonlarda gerekli birçok proteinin prenilasyonunda kullanılan isoprenid lipid üretimini azaltır. Bu olaylarda osteoklast aktivitesinde azalma ve artan apoptozis ile sonuçlanmaktadır.<sup>85</sup>

BF' lar ayrıca kemik iliği stromal hücreleri ve osteoblastları etkileyerek osteoklastik aktiviteyi indirekt olarak inhibe ederler. Osteoprotegrin (OPG) ve Nükleer faktör kappa B ligand reseptör aktivatörü (RANKL), osteoklast formasyonu ve kemik rezorpsiyonunun düzenlenmesinde etkili iki moleküldür. RANKL osteoklast farklılaşması ve aktivasyonunu indüklerken, OPG bu mekanizmayı bloke etmektedir. Normalde osteoblastlar, osteoklast toplanmasını artırır ve osteoblast hücre yüzeyi RANKL ile hematopoetik osteoklast prekürsör hücrelerindeki RANK etkileşimi ile aktive eder. Bu etkileşimi korumak için osteoblastlar OPG salgılar. OPG, osteoklast toplanmasını inhibe etmek ve osteoklast-osteoblast dengesini kontrol etmek için RANKL ile RANK için yarışan çözünebilir sahte hedef reseptörlerdir.<sup>87,177</sup> BF' lar kemik iliği stromal hücreler ve osteoblastlar aracılığı ile RANKL ekspresyonunu inhibe eder ve OPG üretimini artırır. Böylece RANK – RANKL etkileşimi bozulur. Bu

sinerjistik olaylar osteoklast toplanmasının supresyonunu ve kemik resorpsiyonunun azalmasına sebep olur.<sup>106,107</sup>

BF' ların kemikteki metabolik aktivitesi doku, hücre ve moleküler seviyelerdedir.<sup>89,90</sup> BF'ların doku seviyesindeki etkisi kemik turnoverında azalma sağlamaktır ve bu durum hem kemik rezorpsiyonu hem de kemik formasyonunda azalma şeklinde görülür.<sup>172</sup> BF'lar hücresel düzeyde, osteoklastları hedef alırlar ve onların fonksiyonunu bir çok yolla inhibe ederler. Laktik asit üretimini azaltırlar, lizozomal enzim inhibisyonu yaparlar, osteoklast morfolojisi ve mobilitesini etkilerler, osteoklast toplanmasını inhibe ederler, osteoklast ömrünü kısaltır ve bu hücrelerin kemik yüzey aktivitesini inhibe ederler.<sup>108</sup>

BF' ların moleküler düzeydeki etkileri ise ATP analoglarıyla metabolize olarak veya protein prenilasyonunu inhibe ederek gerçekleşmektedir.<sup>171</sup>



**Şekil 6:** Bifosfonatların kemik rezorsiyonunu inhibe etme yolları<sup>171</sup>

BF'lar oral biyoyararlanımı düşük olan ilaçlar olup sistemik biyoyararlanımları %1-%10 arasındadır.<sup>129</sup> BF' lar iskeletle bütünleşince, sadece fizyolojik kemik turnover sırasındaki yıkımlarla kemikten serbest hale gelirler. Rat ve farelerdeki iskeletsel yarı ömür 3 ve 12 ay arasında iken insanlarda >10yıldır.<sup>172</sup> BF' ların yan etkileri: oral yolla kullanıldıklarında bulantı, kusma, diyare, gastrointestinal kanalda tahriş, özefagus ülserleridir.<sup>129</sup> İntravenöz kullanımda ise ateş, miyalji ile karakterize kısa süreli akut reaksiyonlara ve influenza benzeri yan etkilere neden olabilecekleri bildirilmiştir.<sup>178</sup> Son yıllarda özellikle nitrojen içeren BF'ların çene kemiklerinde osteonekrozlara neden olabileceğine dair yayınlar mevcuttur.<sup>179,180</sup> BF'lara bağlı osteonekroz, her iki çenede veya damakta belli bir bölgede kemiğin açığa çıkması ve bu durumun en az 6-8 hafta iyileşmemesi ile karakterizedir. BF kullanımına bağlı oluşan osteonekroz insidansı %1.3 - 7 arasında olup en sık olarak meme kanseri ve multiple myelom olgularında rastlanıldığı bildirilmiştir.<sup>178</sup>

BF kullanımına bağlı gelişen osteonekrozun fizyopatolojisi henüz tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. BF' ların osteoklastlar üzerindeki inhibe edici etkisi kemiğin yeniden yapılanmasını ve muhtemelen anjiogenezisi baskıladığı ve sonuç olarak da çene kemiklerinde osteonekroza neden olabileceği öne sürülmüştür.<sup>181,182</sup>

Geniş epidemiyolojik çalışmalar diabetin alveoler kemik ve ataşman kaybı riskini diabetik olmayan bireylere göre yaklaşık 3 kat arttırdığını göstermiştir.<sup>136-138</sup> Ayrıca periodontitis tedavisinin diabetik bireylerde glisemik kontrolün sağlanmasına katkıda bulunduğu tespit edilmiştir. Yapılan deneysel çalışmalarda bifosfonatlar ve düşük doz doksisisiklinlerin periodontitiste görülen kemik rezorpsiyonunu inhibe edebileceği ve bu ajanların kombine kullanımının sinerjistik etki sağlayarak alveoler kemik yıkımını daha da azaltabileceği bildirilmiştir.<sup>60,92,139,140</sup>

Weinreb ve arkadaşları<sup>183</sup> deneysel periodontitis oluşturulmuş cynomolgus maymunlarında alendronatın alveoler kemik kaybı üzerine etkinliğini histomorfometrik olarak değerlendirmişlerdir. Periodontitis oluşumundan 1 hafta önce hayvanlara 0,05 veya 0,25 mg/kg alendronat intravenöz olarak uygulanmıştır. 0,05 mg/kg'lık alendronatın kemik kaybını belirgin oranda azalttığı, 0,25 mg/kg'ın furkasyon bölgesindeki alveoler kemik kaybını azaltmakta etkili olmadığı, mine-sement birleşim bölgesinde de hafif etkili olduğu bildirilmiştir.

Teronen ve arkadaşlarının<sup>184</sup> yaptıkları in vitro hücre kültür çalışmasında, klodronatın MMP-1,2,3,7,8,9,12,13 ve 14' ün enzimatik aktivitelerini inhibe ettiği gösterilmiştir

Bifosfonatların flap elevasyonu sonucu oluşan kemik kaybını önleyebileceğiyle ilgili çalışmalar da yapılmıştır. Binderman ve arkadaşları<sup>185</sup> 128 wistar ratda farklı konsantrasyonlarda topikal olarak uygulanan alendronatların flap elevasyonu sonrası kemik kaybı üzerine etkisini incelemiş ve 220 - 400 µg dozundaki alendronatın cerrahi bölgesine topikal uygulamasının mukoperiosteal flap cerrahisi sonrası oluşan kemik kaybı miktarını belirgin olarak azalttığını (p<0,001) bildirmişlerdir.

Rocha ve arkadaşları<sup>145</sup> tip 2 diabetli ve periodontal hastalığa sahip bireylerde alendronat'ın kemik kaybını önlemedeki etkisini araştırmışlardır. 40 hastaya 6 ay boyunca oral yolla alendronat (10 mg / gün) veya plasebo verilmiş, iki gruba da mekanik tedavi uygulanmış ve oral hijyen eğitimi verilmiştir. Alveoler kemik sınırı ile mine-sement birleşimi arasındaki mesafe dijital radyografik görüntüleme metodu ile ölçülmüş ve kemik rezorbsiyonunun biyokimyasal bir belirteci olan idrar N-telopeptide (NTx) ve periodontal parametreler incelenmiştir. Sonuç olarak otörler, başlangıç ve 6 ay sonra gruplar arasında diabetin metabolik durumu

bakımından fark bulunmadığını, bununla birlikte periodontal tedavi uygulaması sonucunda iki grupta başlangıca göre kan glukoz seviyesi ve HbA1c değerlerinde azalma gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Tip 2 diabetik hastalarda alveoler kemik sınırı ile mine-sement birleşimi arasındaki mesafenin kontrol grubunda arttığını ve tedavi grubunda  $1,3\pm 1,33$ mm.'lik azalma gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Periodontal parametrelerde düzelme 2 grupta gözlenmesine rağmen tedavi edilen grupta daha iyi sonuçlar elde edilmiş ve 6. ayda tedavi grubu NTx düzeyinde bariz oranda azalma bildirilmiştir. (P=0.006).

Mitsuta ve arkadaşları<sup>143</sup> deneysel periodontitis oluşturulmuş ratlarda topikal uygulanan klodronatın alveoler kemik kaybı üzerine etkisini araştırmıştır. Ratlarda deneysel periodontitis modeli oluşturulmaya başlandığı gün 50 µl klodronat solüsyonu 0, 20, 40 ve 60 Mm konsantrasyonlarda ikişer gün arayla maksiller 1. ve ikinci molar dişler arasındaki subperiosteal palatal bölgeye enjekte edilerek bifosfonatların lokal etkileri histolojik ve radyografik olarak araştırılmıştır. Klodronatın lokal uygulamasının, kemik mineral densitesindeki azalmayı inhibe ettiği, alveoler kemik kaybını önlediği ve kontrol grubuna göre osteoklast sayısında azalma gözlemlendiği bildirilmiştir.

Alencar ve arkadaşları<sup>173</sup>, 72 erkek Wistar ratında oluşturulan deneysel periodontitis modelinde bifosfonat klodronatın antri-resorptif ve anti-inflamatuar parametrelere göre etkilerini histolojik-histomorfometrik olarak incelemişlerdir. Test gruplarına hergün 1, 5 veya 25 mg/kg subkutan klodronat verilmiştir. 0. günden 7. güne kadar profilaktik veya 5. günden 11. güne kadar ise küratif klodronat enjeksiyonu subkutan olarak yapılmıştır. Yine periodontitis oluşturulan kontrol grubuna ise subkutan saline enjeksiyonu yapılmıştır. Klodronat verilmeyen kontrol grubunda belirgin alveoler kemik kaybı, yoğun mononükleer hücre akümülyasyonu ve osteoklast sayısında artış gözlenmiştir. Hem küratif hem

de profilaktik klodronat gruplarında ise kontrol grubuna göre alveoler kemik kaybı ve histopatolojik hücre sayısındaki değişikliklerde istatistiksel düzeyde daha çok azalma görülmüştür.

Tani-ishii ve arkadaşları<sup>172</sup>, *P.gingivalis* inokülasyonu ile deneysel periodontitis oluşturulmuş ratlarda bifosfonat incadronatın periodontal yıkımı önlemedeki etkisini araştırmışlardır. 35 Wistar ratta periodontitis oluşturulmasından sonra, incadronat (2 mg/kg) veya placebo haftada 2 defa olmak üzere oral yolla 2, 4, veya 8 hafta süreyle uygulanmıştır. Radyolojik, morfometrik ve histolojik sonuçlara göre 8 haftalık uygulama sonunda bifosfonatın kemik mineral densitesini artırma, periodontal ligament yıkımını önleme özelliğine sahip olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca dişeti dokusunda PMN infiltrasyonu belirgin oranda azalmıştır.

Duarte ve arkadaşları<sup>144</sup>, overektomi uygulanmış ratlarda ligatür yerleştirilerek oluşturulan deneysel periodontitis modelinde alendronat ve östrojen tedavilerinin kemik kaybı üzerine etkilerini incelemişlerdir. 87 wistar rat üzerinde yapılan çalışmaya göre plaktan bağımsız olarak overektominin alveoler kemik üzerine direkt etkisi olduğu saptanmış ve periodontitisten kaynaklanan kemik kaybında belirgin artış gözlenmiştir. Ligatür yerleştirilmeyen bölgede overektomi etkisi alendronat ve östrojen kullanımıyla azaltılmıştır. Ayrıca alendronat uygulaması periodontitise bağlı kemik kaybında overektominin etkisini belirgin olarak azaltmıştır. Östrojende ise bu durum saptanamamıştır.

Yu ve arkadaşları<sup>186</sup> tarafından yapılan deneysel bir çalışmada 24 adet erişkin erkek Sprague-Dawley ratında streptozotzin enjeksiyonu ile diabet oluşturulmuş, kontrol grubu ratlarında ise diabet oluşturulmamıştır. Deney grubunda 3 hafta süreyle hergün oral yolla karboksimetilsellüloz içerisinde çözünen 0, 1, 2, 5 veya 10mg KOMT-1 uygulaması yapılırken kontrol grubuna ise yine oral yolla sadece

karboksimetilsellüloz verilmiştir. İlaç tedavisinden 3 hafta sonra, ratlar sakrifiye edilerek dişeti, deri ve serum örnekleri alınmıştır. Sonuç olarak, araştırmacılar KMT-1 tedavisinin diabet nedeniyle farklı dokularda artmış kolajenaz aktivitesini inhibe edebileceğini bildirmişlerdir.

Diğer bir çalışmada Ramamurthy ve arkadaşları<sup>187</sup>, normal ve diabetik ratlarda yara iyileşmesini kıyaslamışlar ve topikal uygulanan %1 veya %3' lük konsantrasyonlardaki KOMT-2 uygulamasının 6mm çaplı deri yaralarındaki etkinliğini incelemişlerdir. İyileşmenin 7. gününde, dokular çıkarılarak biyokimyasal analizleri ve histolojik incelemeleri yapılmıştır. Sonuç olarak, diabetik ratlardaki yara bölgelerinin %1 ve %3 lük KOMT-2 ile tedavisinin bölgedeki hidrokspirolin (kolajen içeriği) düzeyini artırdığı ve %3' lük KOMT-2 tedavisinin jelatinaz ve kolajenaz aktivitelerini azalttığı bildirilmiştir. KOMT-2 ile tedavi edilen diabetik ratlarda granülasyon dokusu miktarının ve re-epitelizasyonun tedavi edilmeyen diabetik ratlara göre doza bağımlı olarak daha fazla olduğu da ayrıca tespit edilmiştir.

Choi ve arkadaşlarının<sup>188</sup> çalışmasında kronik periodontitis teşhisi konulmuş 32 kişi 2 gruba ayrılmış, 15 kişi ye KDK+SDD, 17 kişiye KDK+Plasebo tedavisi uygulanmıştır. Başlangıç, 30, 60, 90, 120. günlerde DOS örnekleri, başlangıç ve 120. günlerde ise DOS a ilaveten gingival doku örnekleri alınmıştır. DOS örneklerinde MMP-8, gingival doku örneklerinde ise MMP-9, MMDI-1 ve IL-6 düzeyleri incelenmiştir. Sonuç olarak KDK+SDD grubunda başlangıç değerleri ve plasebo grubuna göre cep derinliği, klinik ataşman seviyesi ve sondlamada kanama yönünden 120. günde anlamlı farklılıklar bulunmuştur. DOS MMP-8 seviyesinde 30, 60 ve 90. günlerde başlangıca göre anlamlı fark bulunmuştur. 120. günde plasebo grubu ve başlangıca göre anlamlı fark kaydedilmiştir. MMP-9 seviyesi yönünden plasebo grubunda artış gözlenirken, KDK+SDD grubunda azalma tespit edilmiş fakat iki grup arasındaki bu fark

istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. MMDI-1 seviyesi yönünden KDK+SDD ve plasebo grupları arasında istatistiksel olarak fark bulunmamışken herbir grubun başlangıçla, 120.gün arasındaki farkı ayrı ayrı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Sonuç olarak araştırmacılar KDK+SDD tedavisinin klinik parametrelerde düzelme sağlayabileceğini ve bu düzelmenin MMP-8 seviyesine de yansıdığını tespit etmişlerdir.

Walker ve arklarının<sup>177</sup> periodontitisli postmenopozal osteopenik hastalarda yaptığı 24 aylık mikrobiyolojik çalışmada SDD (20 mg günde 2 defa) kullanılmıştır. Hastalardan alınan subgingival örneklerde 24 ay SDD kullanımının mikrobiyal flora, total anaerobik değer ve total actinomyces ve streptokok değerine belirgin bir etkisi görülmemiştir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda<sup>178 189</sup> KOMT'lerin BF' lar ile kombine olarak kullanılmasının yükselmiş MMP düzeylerini sinerjistik şekilde inhibe ettiği ve böylece bu ilaçların alveoler kemik kaybını azaltmada oldukça etkili oldukları bildirilmiştir.

Llavaneras ve arkadaşları<sup>149</sup> KOMT-8 ve BF klodronat'ın kombine olarak uygulanmasının deneysel periodontitisli ratlarda dişeti MMP düzeyleri üzerine etkisini incelemiştir. LPS enjeksiyonunun alveoler kemik kaybı ve kolajenaz (MMP-8), jelatinaz (MMP-9) ve elastaz aktivitelerini arttırdığı bildirilmiştir. Tek başına KOMT-8 ve klodronatla tedavi edilen gruplarda doku-yıkım proteinazlarında hafif bir düşüş gözlenmiş ve alveoler kemik kaybında belirgin bir azalma gözlenmemiş, kombinasyon tedavisinde ise patolojik olarak artmış MMP, elastaz seviyeleri ve alveoler kemik kaybının normalize edildiği bildirilmiştir. Sonuç olarak araştırmacılar KOMT-8 ve BF klodronat kombinasyonunun patolojik olarak yükselmiş MMP ve elastaz düzeylerini azaltarak periodontal yıkımı

inhibe etmede tek başına uygulanan KOMT-8 veya BF klodronat' a göre en etkili yöntem olduğunu bildirmişlerdir.

Diğer bir çalışmada Yaffe ve arkadaşları<sup>148</sup> ratlarda tetrasiklinler ve BF alendronat'ın kombine uygulanmasının flap elevasyonu sonrası alveoler kemik yıkımını azaltmadaki etkinliğini incelemişlerdir. Mukoperiosteal flap kaldırılıp lokal olarak alendronat, %1'lik tetrasiklin hidroklorid, %10'luk doksisisiklin hyclate, alendronat + %10'luk doksisisiklin hyclate, alendronat + %1'lik tetrasiklin hidroklorid uygulanmış gruplardaki kemik yıkım miktarları radyografik olarak karşılaştırılmıştır. Rezorpsiyonun engellenmesinde %10'luk doksisisiklinin en etkili ajan olduğu ve %1'lik tetrasiklinin belirgin bir etkisinin olmadığı fakat alendronatla birlikte kullanıldığında sinerjistik etkisi olduğu bildirilmiştir. Aynı zamanda alendronatın doksisisiklinin etkisini fazladan arttırmadığı gözlenmiştir.

Buduneli ve arkadaşlarının<sup>150</sup> 47 sprague-dowley rat üzerinde yaptıkları çalışmada deneysel periodontitis oluşturulmuş ratlarda doksisisiklin ve alendronatın tek başına ve kombine uygulamalarının dişeti PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, Lökotrien B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) ve platelet aktivasyon faktörü (PAF) üzerine etkileri ve alveoler kemik kaybının histomorfometrik analizi incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda kontrol grubuna göre LPS, alendronat +LPS, doksisisiklin+LPS, ve kombinasyon+LPS gruplarında belirgin oranda fazla alveoler kemik kaybı gözlenmiştir (P<0,05). Kombinasyon tedavisi uygulanan grupta dişeti dokusu PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> seviyelerinde LPS grubuna göre belirgin inhibisyon elde edilmiştir (p<0,05). LTB<sub>4</sub> ve PAF seviyelerinde kombinasyon grubunda belirgin azalma sağlanmış olmasına rağmen en çok azalma doksisisiklin grubunda bulgulanmıştır (p<0,05).

Buduneli ve arkadaşları<sup>27</sup> endotoksinle deneysel periodontitis oluşturulmuş ratlarda SDD ve alendronatın tek tek ve kombine

kullanımının dişeti MMP-8, -13, -14, MMP-1 ve Ln-5 ekspresyonu üzerine etkilerini değerlendirmiştir. Çalışmanın sonucunda LPS, doksisisiklin ,alendronat ve kombine ilaç tedavisi gruplarında, salin kontrol grubuna göre anlamlı oranda yüksek alveoler kemik kaybı görülmüştür ( $p<0,05$ ). Tek başına ve kombine kullanılan doksisisiklin ve alendronatın, LPS grubuna göre MMP-8 ekspresyonunu belirgin biçimde azalttığı, yine kombine ilaç uygulamasının yalnız doksisisiklin tedavisine göre MMP-14 seviyelerini belirgin miktarda azalttığı, tek tek doksisisiklin ve alendronat tedavisinin salin ve endotoksin grubuna göre MMP-14 seviyelerinde belirgin artış gösterdiği bildirmiştir. MMP-13 seviyelerinde yalnızca alendronat kullanılan grupta salin, endotoksin, doksisisiklin gruplarına göre anlamlı oranda artış gözlenmiştir. Ln-5 ekspresyonunda gruplar arasında herhangi bir fark bulunmamıştır. Alendronatın veya doksisisiklinin tek tek kullanımı dişetindeki MMP-1 ekspresyonunda belirgin artışla sonuçlanmıştır. Bu çalışmadaki bulgularla alendronat ve/ veya doksisisiklinin MMP-8 ekspresyonunu belirgin oranda inhibe edebileceği ve tek tek ve kombine olarak uygulanmasının periodontal tedaviye faydalı etkiler sağlayabileceği öne sürülmüştür.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi tarafından sağlanan ortalama 250-300 gram ağırlığında 50 adet sağlıklı Wistar türü erkek rat üzerinde gerçekleştirildi. Ratların her biri ayrı kafeslerde 12 saat aydınlık-karanlık siklusunda,  $24 \pm 2$  °C' lik ortamda, standart laboratuvar diyeti ile beslendi. Hayvanların deney süresi içinde istedikleri kadar su içip yem yiyebilmesi sağlandı. Çalışma, Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul Yönergesine uygun olarak gerçekleştirildi.

Deneysel işlemler öncesinde ratların herbiri tartılarak (Resim 1), kuyruk ucundan kan örnekleri alındı ve glukometre cihazıyla\* kan glikoz seviyeleri ölçüldü (Resim 2). 0,1 M sitrik asit ile trisodyumsitrat karıştırılarak elde edilen 0,1 M' lik sitrat tamponu, Hacettepe Üniversitesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı tarafından hazırlandı. Herbir ratın ağırlığına göre hassas terazide tartılan Streptozotzin (STZ)<sup>†</sup> sitrat tamponu içinde çözündürüldü (Resim3, 4, 5). Daha sonra deneysel diabet oluşturmak amacıyla tüm ratlara 50 mg/kg' lık tek doz halinde sitrat tamponu (0,01 M; pH 4,5) içinde çözülen STZ intraperitoneal olarak enjekte edildi (Resim 6).<sup>190</sup> Enjeksiyonu takiben 10. günde, diabetik durumu teyid etmek ve kan glikoz seviyelerini ölçmek amacıyla tüm ratlar tekrar tartıldı ve kan örnekleri alındı.<sup>190, 191</sup> Kan glukoz seviyeleri 250 mg/dl ve üzeri olan ratlar diabetik olarak kabul edildi.<sup>62,191</sup> 50 adet rat her bir grupta rastgele seçilmiş 10 rat olmak üzere gruplandırıldı:

1.grup (diabet kontrol grubu): 1. grubu oluşturan ratlarda intraperitoneal STZ enjeksiyonu sonrası 10. günde kan glikoz seviyeleri >250mg/dl olanlar çalışmaya dahil edildi. 7 gün boyunca günde 1 defa

---

\* Ascensia, Elite- Bayer

† Sigma, St. Louis, MO, USA

herbir rata oral yolla günlük 1ml karboksimetilsellüloz verildi. 7. günün sonunda bir forseps yardımıyla diş mobilitesi lld ve sakrifikasyon işlemine takiben doku örneklere alındı.

2. Grup: (diabet + periodontitis grubu): Diabet oluşunu sağlandıktan sonra deneysel işlemlere gerçekleştirmek amacıyla operasyon öncesi ratlara 25 mg/kg'lık ketalar\* enjeksiyonu yapılarak anestezi sağlandı. Anestezi sonrası plak birikimi sağlamak amacıyla ratların üst 2. molar dişlerinin servikal bölgesine 3.0 kalınlığında ipek sutur† yerleştirildi (Resim 7). Sütürlerin yerleştirilmesini takiben 7-12. günler arasında ratlarda deneysel periodontitis gelişimi gözlendi ve ilaçlar bu günlerden sonra verilmeye başlandı. <sup>192</sup> Ratlara 7 gün boyunca günde 1 defa oral yolla günlük 1ml karboksimetilsellüloz verildi. 7. günün sonunda diş mobilitesi lld ve sakrifikasyon işlemini takiben doku örneklere alındı.

3. Grup: (diabet + periodontitis + doksisisiklin grubu): Ratlarda STZ enjeksiyonu ile diabet ve deneysel periodontitis oluşumunu takiben 7 gün boyunca günde 1 defa oral yolla 6mg/kg<sup>193</sup> doksisisiklin‡ içeren 1 ml karboksimetilsellüloz verildi(Resim 8). 7. günün sonunda diş mobilitesi lld ve sakrifikasyon işlemini takiben doku örneklere alındı.

4. Grup: (diabet + periodontitis + bifosfonat grubu): Ratlarda STZ enjeksiyonu ile diabet ve deneysel periodontitis oluşumunu takiben 7 gün boyunca günde 1 defa subkutan olarak 25mg/kg bifosfonat klodronat § enjekte edildi(Resim 9).<sup>194</sup> 7. günün sonunda diş mobilitesi lld ve sakrifikasyon işlemini takiben doku örneklere alındı.

---

\* Ketalar, E. Warner Lambert

† İpek sutur 3/0 Doğsan

‡ Doksisisiklin HCL, Fako İlaç Sanayii

§ Bonefoss 60 mg/ml enjektabl zlti, Er-kim İlaç Sanayii

5. Grup: (diabet + periodontitis + kombine tedavi grubu):  
Ratlarda STZ enjeksiyonu ile diabet ve deneysel periodontitis oluşumunu takiben önceki dozlara uygun şekilde 7 gün boyunca hem oral yolla doksisisiklin hem de subkutan bifosfonat enjeksiyonu yapıldı. 7. günün sonunda diş mobilitesi lld ve sakrifikasyon işlemini takiben doku örneklere alındı.

Dişlerdeki mobilite miktarı ;

0: mobilite yok,

1: hafif mobilite (vestibüler-palatinal),

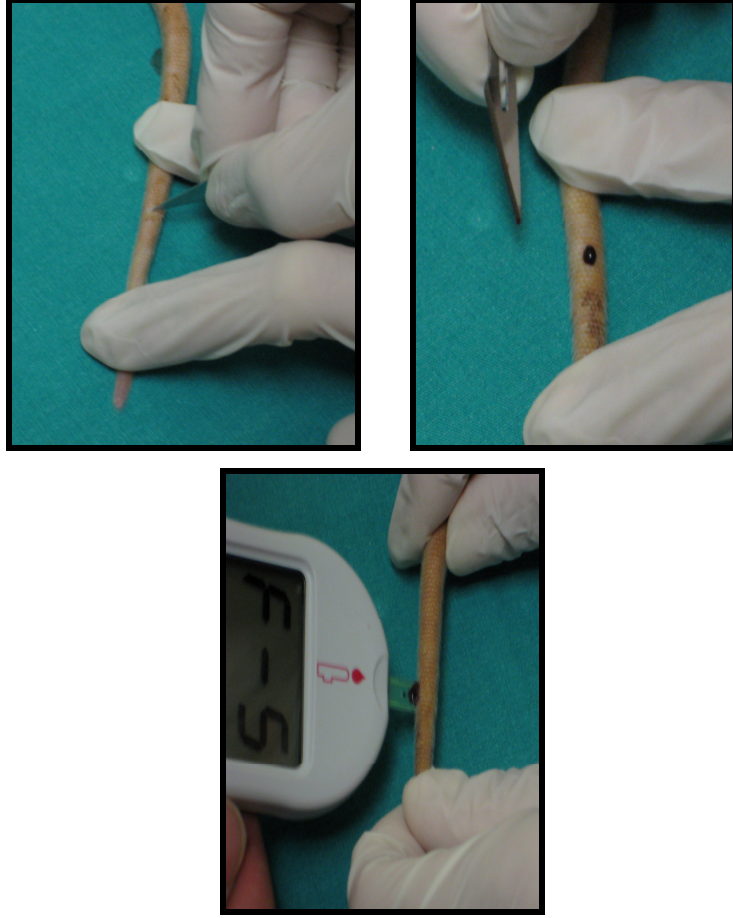
2: orta seviyede mobilite (vestibüler-palatinal),

3: şiddetli mobilite. (soketin içinde vertikal diş hareketleri)

şeklinde değerlendirildi.<sup>28 195</sup>



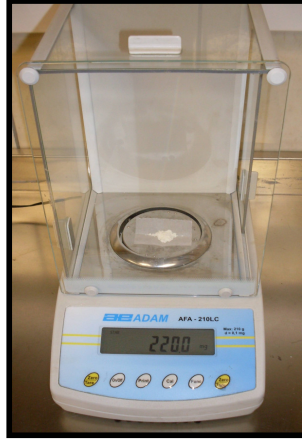
Resim 1: Ratların vücut ağırlığının llmesi



**Resim 2: Ratların kan glukoz seviyelerinin tesbiti amacıyla kuyruk veninden kan alımı ve glukometre cihazı ile ölçümü**



**Resim 3: Deneysel diabet oluşturmak amacıyla kullanılan STZ**



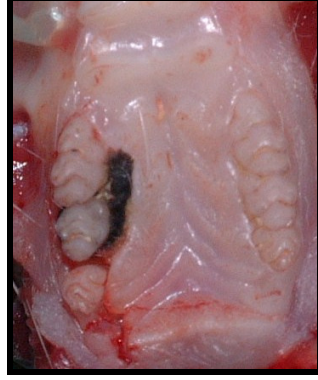
**Resim 4: STZ ağırlıklarının tesbiti amacıyla kullanılan hassas terazi**



**Resim 5: STZ' in sitrat tamponuyla karıştırılması**



**Resim 6: Deneysel diabet oluşturmak amacıyla hazırlanmış STZ' in ratlara intraperitonel olarak enjekte edilmesi**



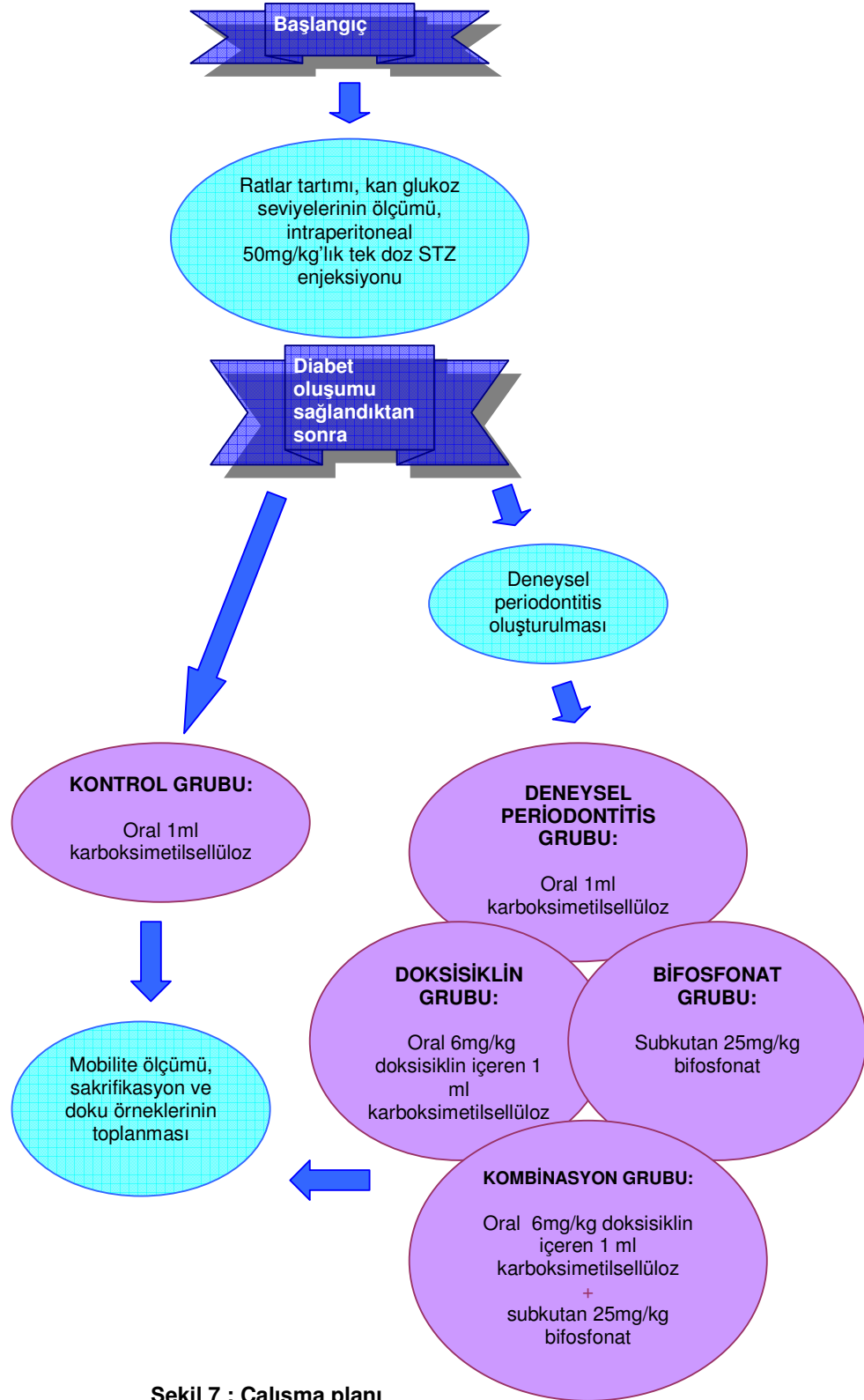
**Resim 7: Deneysel periodontitis oluşturmak amacıyla rat üst çenesinde 2. molar diş çevresine yerleştirilen 3.0 ipek suture**



**Resim 8: Ratlara oral yolla doksisisiklin verilmesi**



**Resim 9: Ratlara subkutan yolla klodronat enjeksiyonu**



Şekil 7 : Çalışma planı

7. günün sonunda ratlara yüksek dozda anestezi verilerek servikal blokaj yöntemiyle ötanazi uygulandı. İmmünohistokimyasal ve histomorfometrik analizler için maksiller molar dişlerin bukkal bölgesinden 3x3 mm boyutlarında dişeti ve blok alveoler kemik dokusu örnekleri eksizyonel biopsi şeklinde alındı.

Elde edilen örnekler, %10'luk tamponlanmış formalin solüsyonunda 24–72 saat fikse edildikten sonra rutin doku takip prosedürü sonrasında parafin bloklara gömüldü. Histolojik ve immünohistokimyasal analizler için dokulardan, adheziv lamlara\* yaklaşık 4 µm kalınlığında kesitler alındı.

Histopatolojik inceleme için kesitler 65°C'de etüv içinde deparafinize edilip, sırasıyla 30'ar dakika ksilol ve alkolde bekletildikten sonra çeşme suyunda yıkandı ve hemaotoksilen-eozin (H&E) ile boyama işlemine tabi tutuldu.

### **İmmünohistokimyasal Yöntem:**

IL1-β, MMP-2 ve MMP-9 antikorları için Avidin-Biyotin Kompleks (ABC) metodu ile immünohistokimyasal olarak boyanma yapıldı.

Kesitler etüv içerisinde 56°C'de 12 saat bekletildikten sonra 30 dakika süreyle ksilol ile muamele edilerek deparafinizasyona tabi tutuldu ve beşer dakika süreyle sırasıyla %100, %96 ve %90'lık etil alkolde bekletilerek dehidratasyon işlemleri gerçekleştirildi. Kesitler 1 dakika çeşme suyunda yıkandıktan sonra distile sudan geçirildi. Endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek için distile su içinde hazırlanmış %3 hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 10 dakika süreyle uygulandı. Kesitler fosfatla tamponlanmış serum (PBS, Fosfat Buffer Solüsyonu, pH:7,60) ile

---

\* Surgipath, X-tra Adhesive Microslides, Illinois, USA

püskürtme yöntemi kullanılarak iyice yıkandı. Formalin fiksasyonu ve parafin bloklama nedeniyle dokuda maskelenmiş olan antijenik yapıları açığa çıkarmak amacıyla her üç antikorun da uygulanacağı kesitler antijen retrieval solüsyonu (0,01M sodyum sitrat buffer, pH:6,00) içerisinde ilk on dakika orta son beş dakika yüksek derecede olmak üzere 15 dakika mikrodalga fırında işleminden geçirildi. Takiben kesitler oda ısısında 30 dakika bekletildi ve distile su ve sonra PBS ile üç kez yıkandı.

IL1- $\beta$  ve MMP-2 boyaması için Zymed Histostain Plus Broad Spectrum<sup>†</sup> ve MMP-9 boyaması için Santa Cruz goat ABC staining System<sup>‡</sup> kullanıldı. Kesitler 5-10 dakika süreyle non-immün bloklama serumunda bekletildi. Daha sonra IL1- $\beta$ <sup>§</sup>, MMP-2<sup>\*\*</sup> ve MMP-9<sup>††</sup>, primer antikorlarıyla +4°C'de 18-20 saat süreyle muamele edildi. Oda ısısına erişen kesitler PBS ile 5 dakika püskürtme yöntemi ile yıkama yapıp kurulandıktan sonra biyotine bağlanmış bağlayıcı (sekonder) antikor 20-30 dakika uygulandı. Kesitler yeniden PBS ile yıkayıp kurulandıktan sonra streptavidin ile konjuge alkalen fosfataz uygulanarak 20-30 dakika bekletildi. Takiben kesitler PBS ile yıkandı ve kurulandı.

Renk vererek görüntülemeyi sağlamak amacıyla kesitler yaklaşık 5-8 dakika süre ile 3-3' diaminobenzidine tetrachloride solüsyonu<sup>‡‡</sup> ile inkübe edildi. Kesitler daha sonra üç kez distile sudan geçirildi. Zemin boyaması için Harris hematoksilende 5 saniye bekletildi. Kesitler önce çeşme suyunda ardından distile suda yıkandıktan sonra 5 dakika % 96 alkolde fiksasyonları sağlandı. Ksilol içinde 5 dakika bekletilen kesitlerin üzerleri entellan<sup>§§</sup> kullanılarak kapatıldı.

---

<sup>†</sup> Zymed laboratories Inc., Lot 1385070 Carlsbad, CA, USA

<sup>‡</sup> ABC kit, Lot: sc-2023, Santa Cruz Biotechnology, Inc. CA, U.S.A

<sup>§</sup> IL-1 $\beta$  rabbit polyclonal antibody, Lot: sc-7884, Santa Cruz Biotechnology, Inc. CA, U.S.A

<sup>\*\*</sup> MMP-2 mouse monoclonal antibody, Lot: sc-13595, Santa Cruz Biotechnology, Inc. CA, U.S.A

<sup>††</sup> MMP-9 goat polyclonal antibody, Lot: sc-6840, Santa Cruz Biotechnology, Inc. CA, U.S.A

<sup>‡‡</sup> DAB, substarate kit, Lot: 11067520, Zymed S.San Francisco, California, USA

<sup>§§</sup> Clearmount, Lot:10364117, Zymed S.San Francisco, California, USA

Pozitif kontrol olarak MMP-2 ve MMP-9 antikoru için plasenta dokusu, IL-1 $\beta$  için ise deri dokusu kullanıldı. Primer antikor uygulanması aşamasında PBS içerisinde bekletilen plasenta ve deri dokuları negatif kontrol olarak kabul edildi.

Vakalara ait tüm histopatolojik değerlendirmeler Leica DM 4000 B<sup>\*\*\*</sup> ışık mikroskopunda yapıldı.

Bukkal mukozaya ait örneklerin H&E boyalı kesitlerinde, epiteldeki akantoz ve rete proliferasyonu, bağ dokusunun selüleritesi, damarlanma miktarı ve inflamatuvar hücre infiltrasyon yoğunluğu değerlendirildi.

İnflamasyon yoğunluğunun değerlendirilmesi x400 büyütmede bağ dokusunda yer alan inflamatuvar hücrelerin sayılması ile gerçekleştirildi. H&E kesitlerde rastgele seçilen beş büyük büyütme alanındaki inflamatuvar hücreler sayıldı ve inflamasyon yoğunluğu dört dereceli bir sistem ile skorlandı.<sup>196</sup>

0: İnflamasyon yok

1: Alan başına 15 inflamatuvar hücreden az

2: Alan başına 15–50 inflamatuvar hücre

3: Alan başına 50 veya daha fazla inflamatuvar hücre.

### **İmmünohistokimya Boyanmalarının Değerlendirilmesi:**

Tüm antikolar ile boyanan kesitlerde kahverengi renkteki stoplazmik boyanma pozitif olarak kabul edildi.

---

<sup>\*\*\*</sup> Leica microsystems GmbH, Wetzlar, Germany

İnflamatuvar hücrelerdeki ekspresyon yoğunluğu ise, rastgele seçilen üç büyük büyütme alanındaki pozitif inflamatuvar hücrelerin sayılması ve dört dereceli bir sistem ile skorlanması ile değerlendirildi.<sup>27</sup>

- 0: Ekspresyon yok
- 1: Zayıf ekspresyon (<8 hücre)
- 2: Orta derecede ekspresyon (9-14)
- 3: Şiddetli ekspresyon (15-20)
- 4. Çok şiddetli ekspresyon (>20 hücre)

Örneklere ait fotoğraflar ışık mikroskobu fotoğraf sistemine ait Nikon Coolpix 5000 marka fotoğraf makinesi ile görüntülendi.

### **Alveoler Kemik Kaybının Ölçümü:**

Sert doku örnekleri 10 dakika kaynatılarak, yumuşak dokular uzaklaştırıldı. Kalan yumuşak doku eliminasyonu için örnekler 0,2N NaOH 'de oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. Daha sonra örnekler yıkandı, havayla kurutuldu ve %1'lik metilen mavisiyle boyandı ve bu şekilde mine-sement sınırı belirlendi.<sup>27</sup> Örneklerin Nikon coolpix 5000 marka fotoğraf makinesiyle x20 büyütmede makroskobik fotoğrafları çekildi. Mine-sement sınırı-alveoler kemik kreti arasındaki mesafe LeicaQwin Plus v3.3.1 görüntü analiz programı<sup>†††</sup> kullanılarak 22 bölgede ölçüldü. Yapılan ölçümlerin ortalaması ile elde edilen milimetre cinsinden değer herbir örnek için kemik kaybı olarak kaydedildi.

---

<sup>†††</sup> Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany

## İstatistiksel Değerlendirme

Verilerin analizi SPSS for Windows 11.5 paket programında yapıldı. Tanımlayıcı istatistikler ağırlık, kan glukoz seviyesi, mine sement hududu – alveoler kemik meafesi için ortalama  $\pm$  standart sapma şeklinde, inflamasyon, MMP-2, MMP-9, IL-1 $\beta$  bağ doku ekspresyon skorları ve mobilite ise ortanca (25-75 yüzdelik) olarak gösterildi. Gruplar arasında mine sement hududu - alveoler kret mesafesi ortalamaları yönünden istatistiksel olarak anlamlı farkın olup olmadığı Tek Yönlü Varyans Analizi ile inflamasyon, MMP-2, MMP-9, IL-1 $\beta$  bağ doku ekspresyon skorları ve mobilite ortancaları yönünden farkın anlamlılığı ise Kruskal Wallis testi ile incelendi. Tek Yönlü Varyans Analizi veya Kruskal Wallis test istatistiği sonucunun önemli bulunduğu durumlarda anlamlı farka neden olan grupları tespit etmek amacıyla sırasıyla; post hoc Tukey veya parametrik olmayan çoklu karşılaştıra testleri kullanıldı. Değişkenler arasındaki doğrusal ilişkinin büyüklüğü Spearman'ın "rho" katsayısı ve önemlilik düzeyi saptanarak değerlendirildi.  $p < 0.05$  için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## BULGULAR

### Klinik, Histolojik ve Histomorfometrik Bulgular

Çalışmamızda yer alan tüm gruplar için ilk ve son ağırlık ve kan glukoz seviyeleri arasındaki ortalama değerler tablo 1’de verilmiştir.

**Tablo 5.** Gruplara göre ratların ilk-son ağırlık ve ilk-son kan glukoz ortalama değerleri

Değişkenler	Grup I (Ortalama±SS) (n=10)	GrupII (Ortalama±SS) (n=10)	Grup III (Ortalama±SS) (n=10)	Grup IV (Ortalama±SS) (n=10)	GrupV (Ortalama±SS) (n=10)
İlk Ağırlık (gr)	235.9±38.0	265.4±49.4	258.9±36.7	299.1±32.9	258.5±34.6
İlk Kan Glukoz değeri (mg/dl)	105.1±17.7	91.4±12.3	124.7±14.7	123.8±33.5	108.2±11.7
Son Ağırlık (gr)	205.7±32.4	238.3±38.9	246.6±38.8	269.9±31.5	236.9±35.9
Son Kan Glukoz değeri (mg/dl)	431.1±78.8	402.6±105.3	448.6±116.8	486.7±67.0	448.0±50.7

**Grup I:** Diabet

**Grup II:** Diabet+ Periodontitis

**Grup III:** Diabet+ Periodontitis+ Doksisisiklin

**Grup IV:** Diabet+ Periodontitis+ Klodronat

**Grup V:** Diabet+ Periodontitis+ Kombine tedavi

Çalışmada herbir deney grubunda 10’ar adet rat kullanılmış ve tüm ratlarda deney başlangıcına göre kilo kaybı ve bununla birlikte kan glukoz düzeylerinde başlangıç değerlerine göre artış gözlenmiştir (Tablo 1).

Ligatürle deneysel periodontitis oluşumuna bağlı olarak ratların dişeti dokularında inflamatuvar cevabın klinik belirtileri olan ödem, kızarıklık, kanama ve frajilite gözlenmiştir.

Gruplar arası enflamasyon skorları, mine sement hududu-alveoler kret arası mesafe ve mobilite skorlarının dağılımı tablo 2'de verilmiştir.

**Tablo 6.** Gruplar arası inflamasyon ve mobilite skorlarının dağılımı (ortanca (%25-%75 yüzdilik) ) ve mine sement hududu - alveoler kret arası mesafe (ortalama±SS)

Değişkenler	Grup I (n=10)	Grup II (n=10)	Grup III (n=10)	Grup IV (n=10)	Grup V (n=10)	P
<b>İnflamasyon</b>	1 (0-1)	3 (1-3) <sup>c</sup>	3 (2-3) <sup>c</sup>	2 (1-2) <sup>c,d</sup>	2.5 (2-3) <sup>c</sup>	<b>&lt;0.001<sup>a</sup></b>
<b>Mine Sement Hududu- Alveoler Kret Mesafesi (mm)</b>	0.26±0.06	0.54±0.15 <sup>c</sup>	0.47±0.14 <sup>c</sup>	0.46±0.09 <sup>c</sup>	0.51±0.11 <sup>c</sup>	<b>&lt;0.001<sup>b</sup></b>
<b>Mobilite</b>	0 (0-0.5)	2(1.5-2.5) <sup>c,e</sup>	1.5(1.5-2.0) <sup>c</sup>	1.5(1-1.5) <sup>c</sup>	2 (1.5-2.5) <sup>c,e</sup>	<b>&lt;0.001<sup>a</sup></b>

a Kruskal Wallis testi.

b Tek Yönlü Varyans Analizi

c Grup I ile arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05).

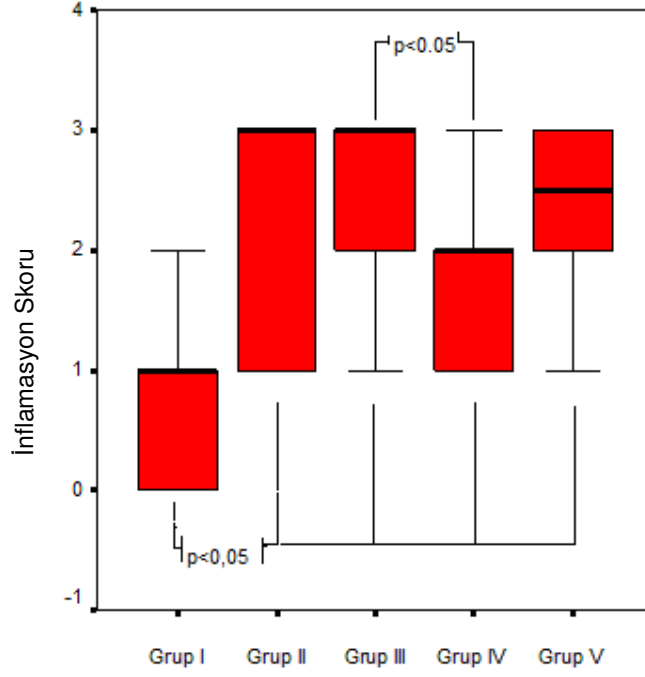
d Grup III ile arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05).

e Grup IV ile arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05).

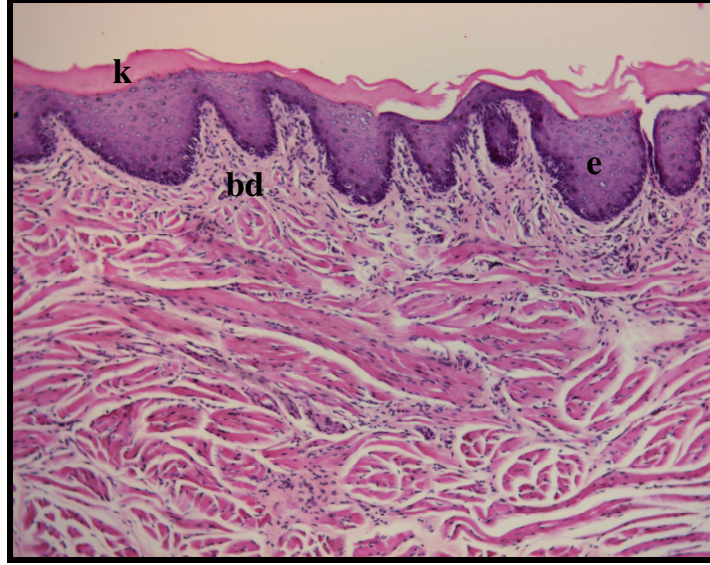
Gruplar arası enflamasyon skorları arasındaki fark değerlendirildiğinde grup 2, 3, 4 ve 5'de grup 1'e göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir (p<0,05). Bununla birlikte grup 4'de grup 3'e göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir. (p<0,05). (Şekil 1, Tablo 2)

1. gruptaki tüm ratların bukkal mukozaya ait yumuşak doku kesitlerinde, yüzeyde hiperkeratoz, çok katlı yassı epitelde akantoz ve rete-peg formasyonu, ince fibriller yapıdaki bağ dokusunda çok hafif inflamasyon izlenmiştir. 2, 3, 4 ve 5. gruptaki yumuşak doku kesitlerinde ise akantotik, hiperkeratinize çok katlı yassı epitel altındaki

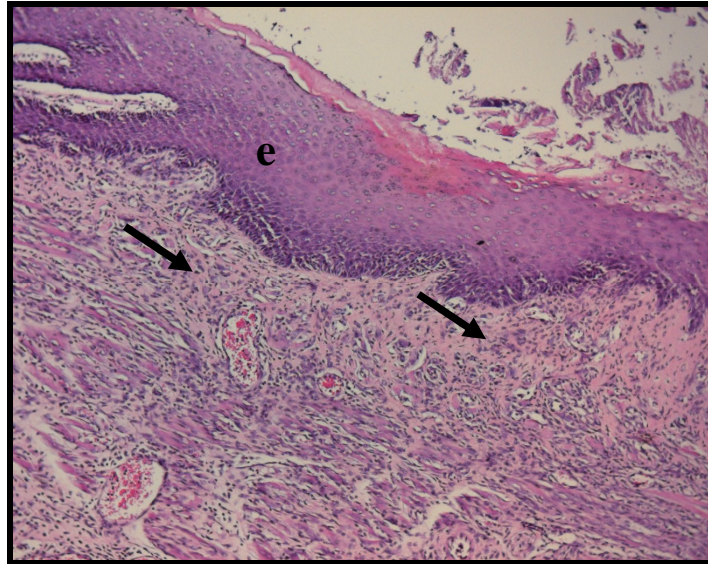
selüler bağ dokusunda belirgin mononükleer inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve konjese damarlar izlenmiştir.



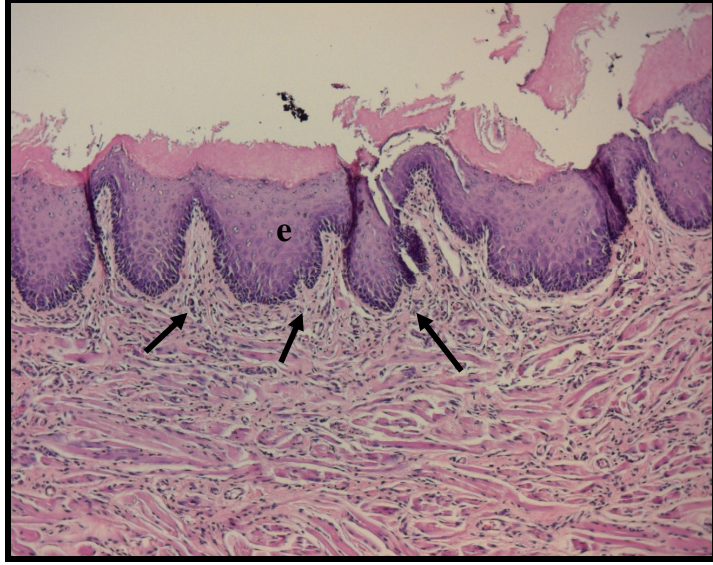
Şekil 8. Gruplar Arasında İnflamasyon Skorlarının Dağılımı



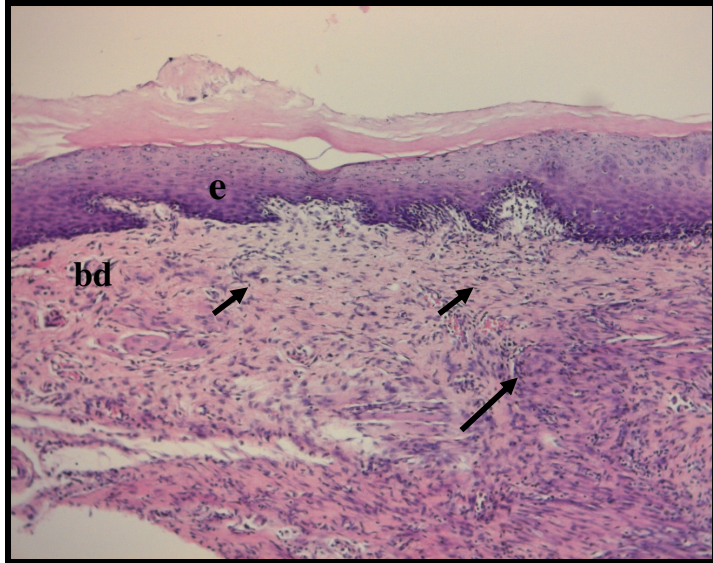
Resim 10. Grup 1' e ait keratinize (k) çok katlı yassı epitel (e) ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu içermeyen bağ dokusu(bd) görüntüsü (x 100, H&E).



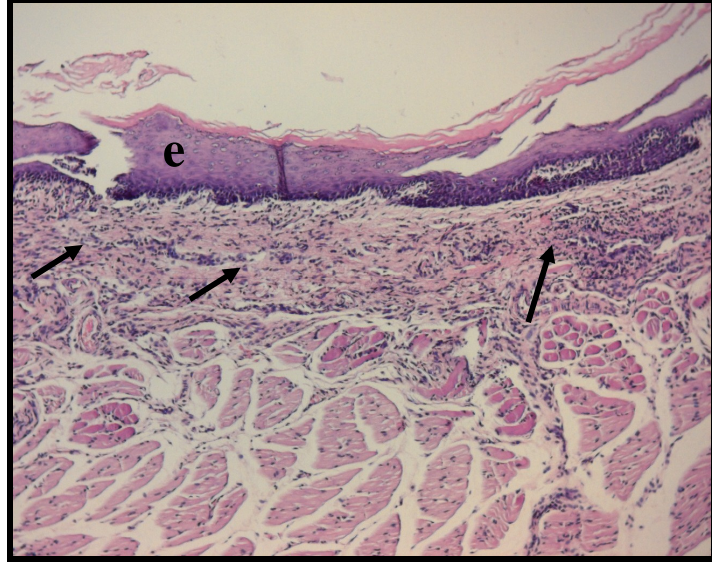
Resim11. Grup 2' ye ait çok katlı yassı epitel (e) altında, lamina propriada yoğun lenfositik infiltrasyon (oklar) görüntüsü (x 100, H&E).



**Resim12.** Grup 3' e ait çok katlı yassı epitel (e) altında, lamina propriada yoğun lenfositik infiltrasyon (oklar) görüntüsü (x 100, H&E).

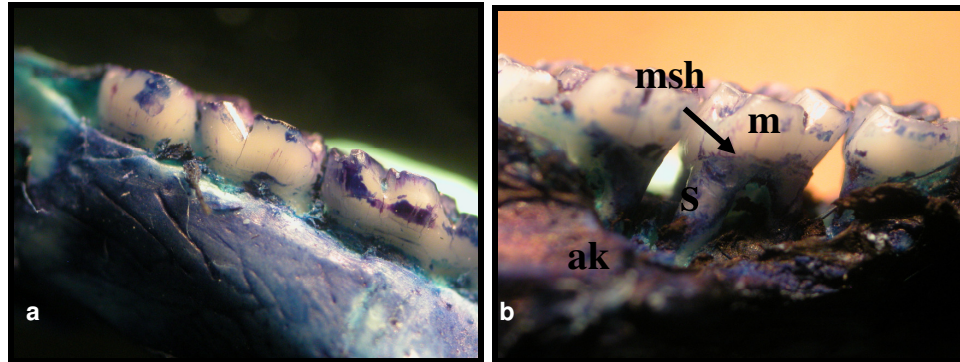


**Resim 13:** Grup 4 'e ait çok katlı yassı epitel (e)altında, bağ Dokusunda (bd) yoğun lenfositik infiltrasyon (oklar) (x 100, H&E).

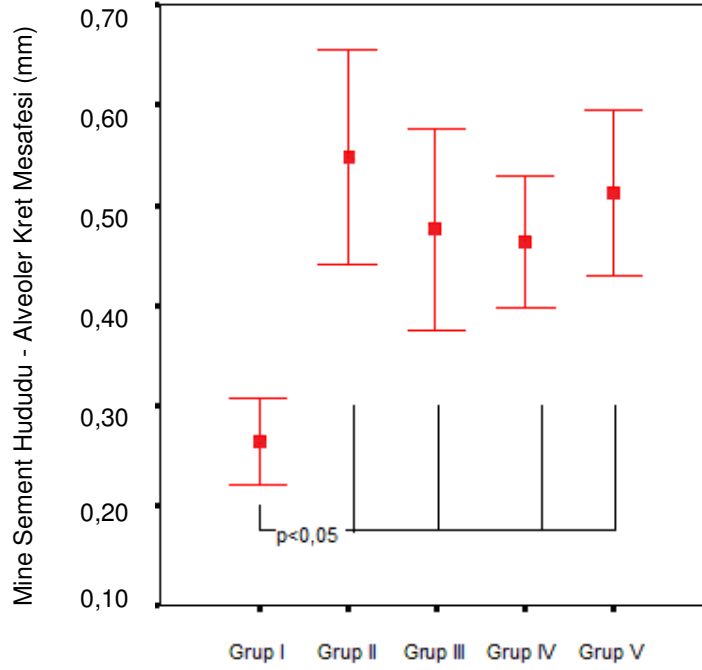


**Resim 14: Grup 5' e ait çok katlı yassı epitel (e) altında, lamina propriada yoğun lenfositik infiltrasyon (oklar) (x 100, H&E).**

Gruplar arası mine sement hududu-alveoler kret arası mesafe ölçümleri karşılaştırıldığında grup 2, 3, 4 ve 5'de grup 1'e göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenirken ( $p < 0,05$ ) grup 2, 3, 4 ve 5' in birbirleri arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır (Şekil 4, Tablo 2).

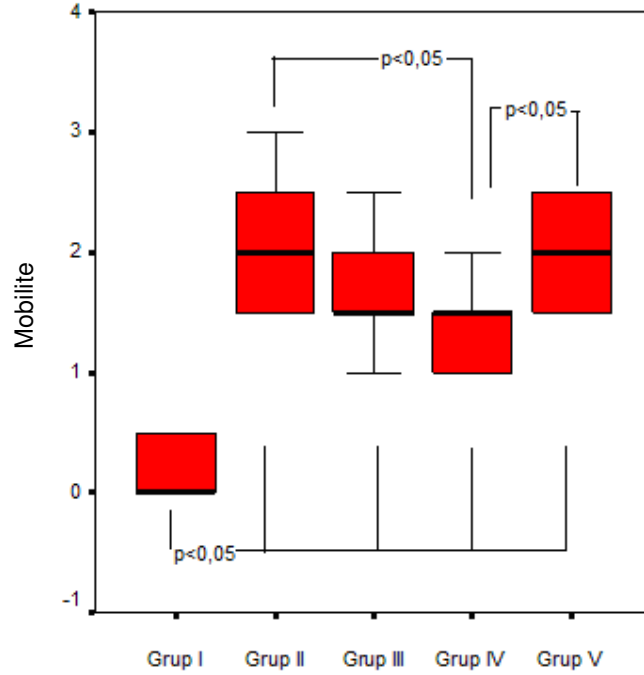


**Resim 15 : Örneklerin %1'lik metilen mavisiyle boyandıktan sonra x 20 büyütmede çekilen fotoğrafları. Kontrol grubuna (a) kıyasla deneysel periodontitis oluşumu sonucu görülen alveoler kemik (ak) kaybı (b). Sement (s), mine (m), mine-sement hududu (msh)**



**Şekil 9.** Gruplar Arasında Mine Sement Hududu – Alveoler Kret Mesafesinin Dağılımı

Gruplar arası mobilite skorları değerlendirildiğinde grup 2, 3, 4 ve 5’de grup 1’e göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir ( $p<0,05$ ). Bununla birlikte grup 4’de grup 2’ye ve grup 5’e göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir ( $p<0,05$ ) (Şekil 5, Tablo 2).



Şekil 10. Gruplar Arasında Mobilite Skorlarının Dağılımı

## İmmünohistokimyasal Bulgular

Dişeti bağ dokusu MMP-2, MMP-9, IL-1 $\beta$  immünohistokimyasal ekspresyon skorları tablo 3'te verilmiştir.

**Tablo 7.** Gruplar arası dişeti bağ dokusu MMP-9, MMP-2, IL-1 $\beta$  immünohistokimyasal ekspresyon skorları (ortanca(%25-%75 yüzdelik))

Değişkenler	Grup I (n=10)	Grup II (n=10)	Grup III (n=10)	Grup IV (n=10)	Grup V (n=10)	P
<b>MMP-9</b>	1 (0-1)	2 (1-4) <sup>b</sup>	0 (0-0) <sup>b,d</sup>	0 (0-1) <sup>d</sup>	0 (0-1.5) <sup>c,d</sup>	<b>&lt;0.001<sup>a</sup></b>
<b>MMP-2</b>	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-1)	0 (0-0.5)	0 (0-0)	0.166 <sup>a</sup>
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	1 (0-1) <sup>d</sup>	2 (1-3)	0,5(0-2) <sup>d</sup>	0 (0-0.25) <sup>d</sup>	0 (0-1.5) <sup>d</sup>	<b>0.013<sup>a</sup></b>

a Kruskal Wallis testi.

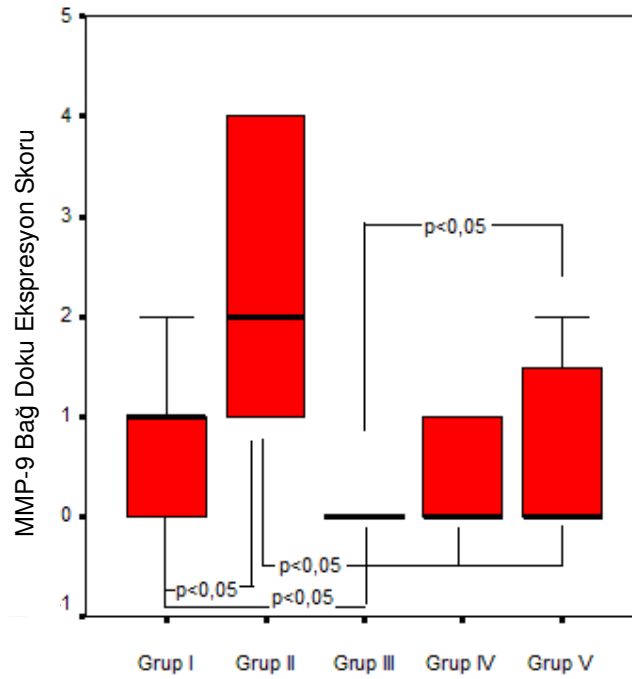
b Grup I ile arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05).

c Grup III ile arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05).

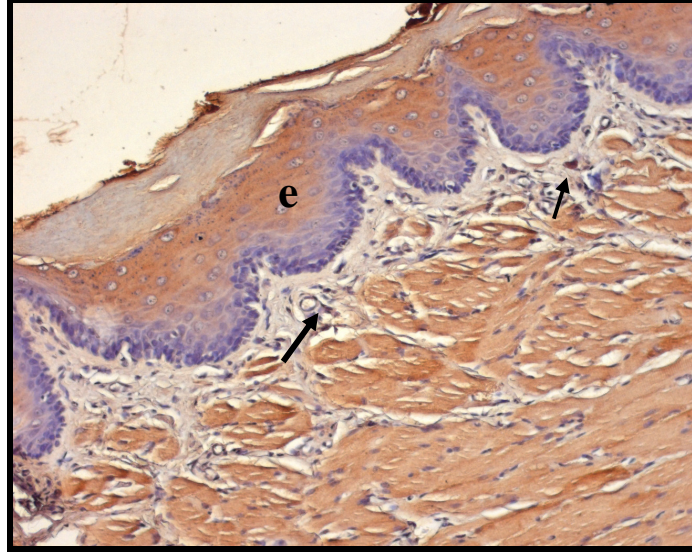
d Grup II ile arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı (p<0.01)

Yapılan mikroskopik incelemelerde MMP-2, MMP-9 ve IL-1 $\beta$  immunoreaktivitesi hücrelerin sitoplazmalarının değişen yoğunlukta koyu kahverengi olarak boyanması ile belirlenmiştir.

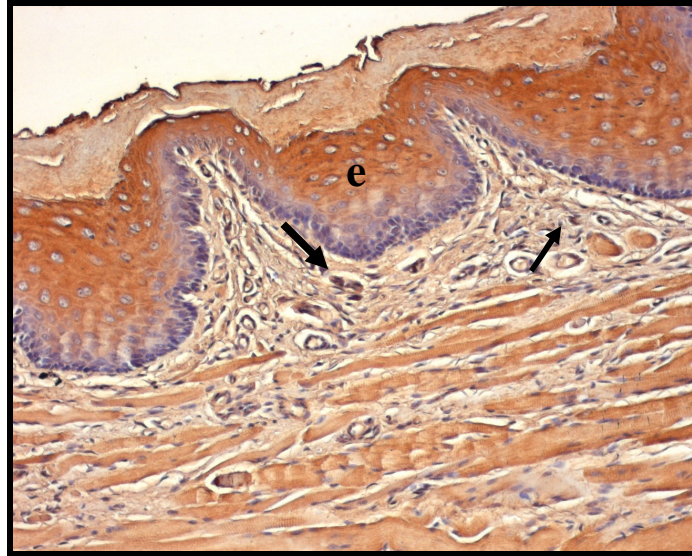
Gruplar arası dişeti bağ dokusu MMP-9 ekspresyon skorlarında grup 2'de grup 1'e göre anlamlı oranda artış ve grup 3'de grup 1'e göre anlamlı oranda azalma gözlenmiştir. ( $p < 0,05$ ) Bununla birlikte, grup 3, 4 ve 5 'de grup 2'ye göre ( $p < 0,01$ ) grup 3'de grup 5'e göre ( $p < 0,05$ ) istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir.(şekil 2)



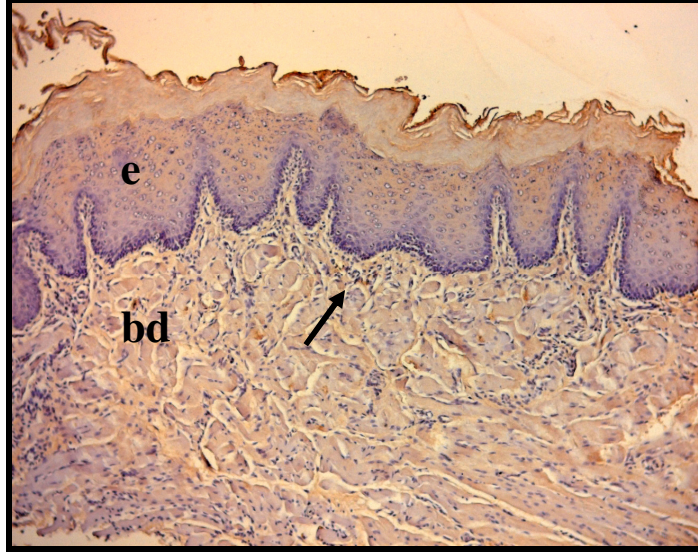
Şekil 11. Gruplar Arasında MMP-9 Bağ Doku Ekspresyon Skorlarının Dağılımı



**Resim 16. Grup 1'e ait bazal tabaka hücreleri hariç epitelin (e) tüm tabakalarında ve inflamatuvar hücrelerde hafif izlenen MMP-9 pozitifliği görüntüsü (oklar) (x100, DAB).**



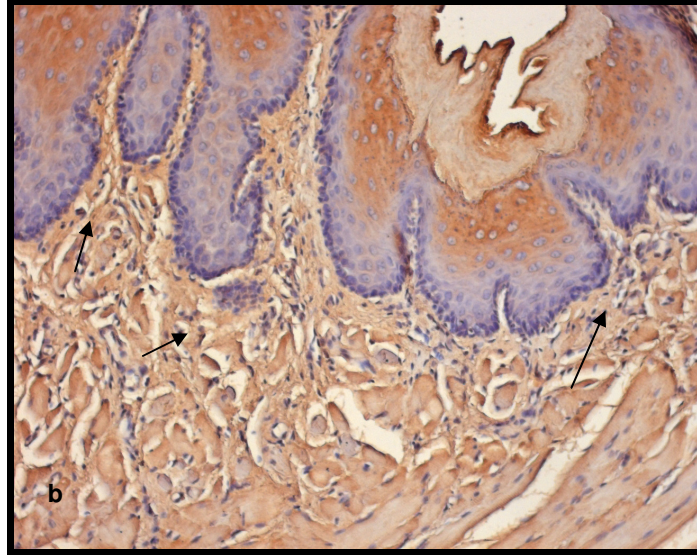
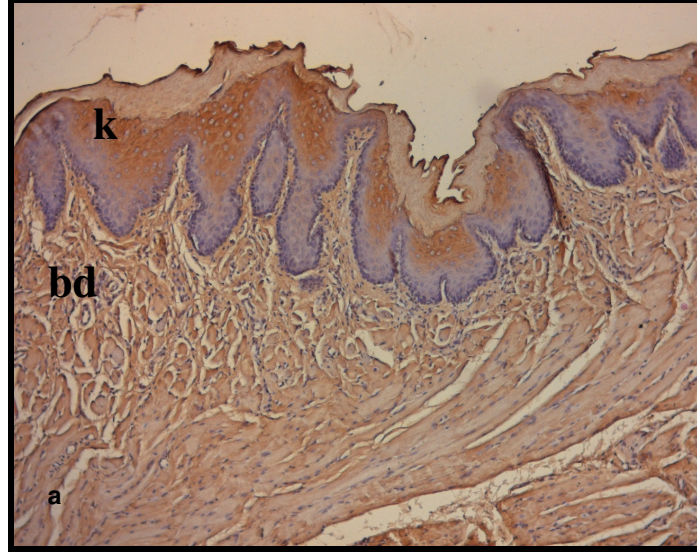
**Resim 17. Grup 2'ye ait epitelin (e) bazal tabaka hücreleri hariç tüm tabakalarında ve inflamatuvar hücrelerde (oklar) izlenen yoğun MMP-9 pozitifliği görüntüsü (x100, DAB).**



Resim 18. Grup 3' e ait çok katlı yassı epitelde (e) ve bağ dokusunda (bd) izlenen zayıf MMP-9 ekspresyonu (ok) görüntüsü (x100, DAB).

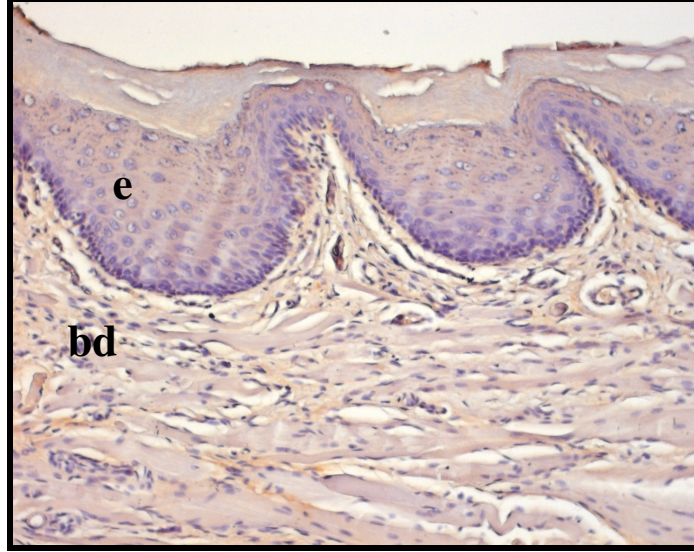


Resim 19. Grup 4'e ait keratinositlerde (k) ve bağ dokusunda (bd) izlenen zayıf MMP-9 ekspresyonu görüntüsü (x200, DAB).



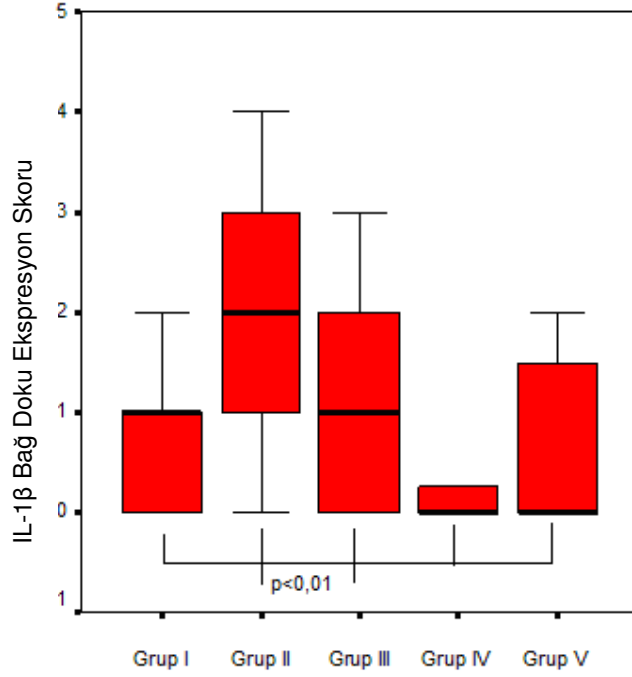
**Resim 20 (a,b). grup 5'e ait keratinositler (k) ve bağ dokusundaki (bd) inflamatuvar hücrelerde izlenen hafif MMP-9 pozitifliği (oklar) görüntüsü (a:x100, b:x200, DAB).**

Gruplara ait örneklerin hemen hiçbirinde, bağ doku hücreleri ve inflamatuvar hücrelerde MMP-2 ekspresyonu izlenmemiş ve gruplar arası dişeti bağ dokusu MMP-2 ekspresyon skorlarında da gruplar arası anlamlı bir fark bulunamamıştır.

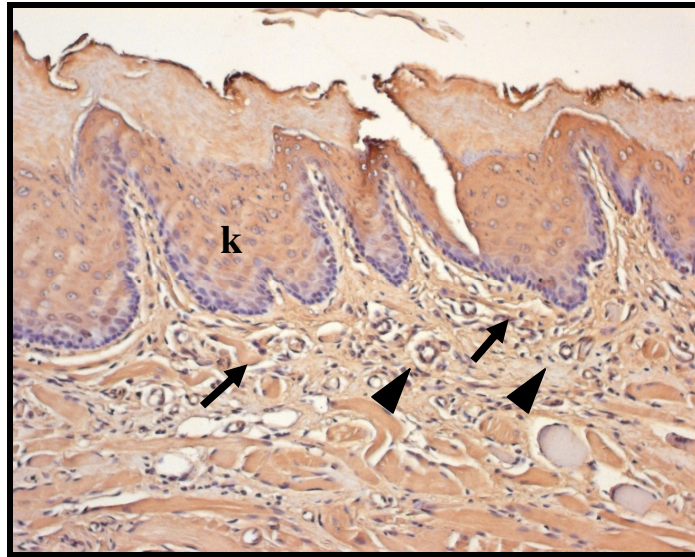


**Resim 21. Epitel (e) ve bağ dokusu (bd) hücrelerinde MMP-2 pozitifliğinin izlenemediği bir örnek görüntü (x100,DAB).**

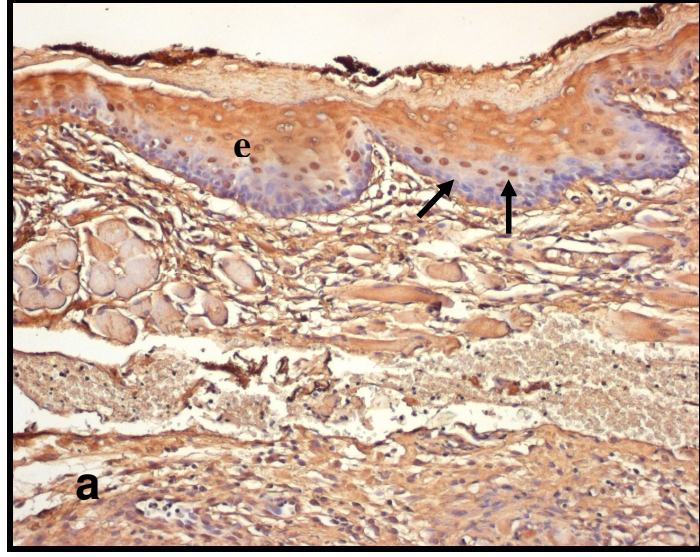
Gruplar arası IL-1 $\beta$  bağ doku ekspresyon skorları değerlendirildiğinde grup 2 ile karşılaştırıldığında grup 1, 3, 4 ve 5'de istatistiksel olarak anlamlı oranda azalma gözlenmiştir( $p<0,01$ ). (şekil 3)



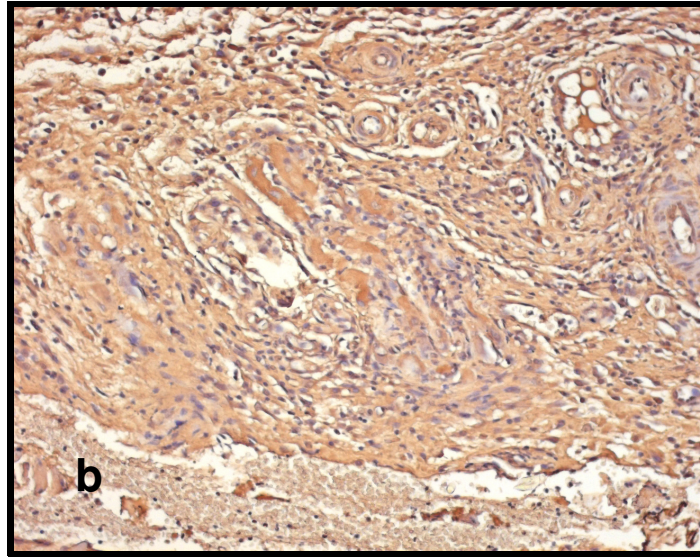
**Şekil 12.** Gruplar Arasında IL-1 $\beta$  Bağ Doku Ekspresyon Skorlarının Dağılımı



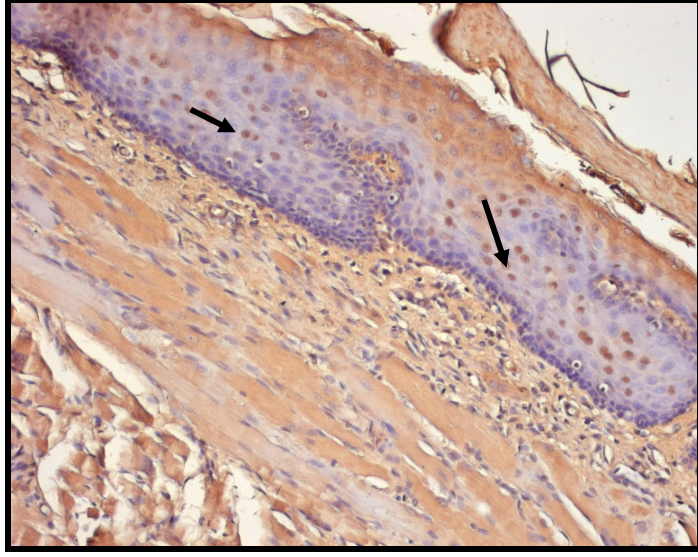
**Resim 22.** Grup 1'e ait keratinositlerde (k), endotellerde (üçgen oklar) ve inflamatuvar hücrelerde (oklar) izlenen IL-1 $\beta$  pozitifliği görüntüsü (x100, DAB).



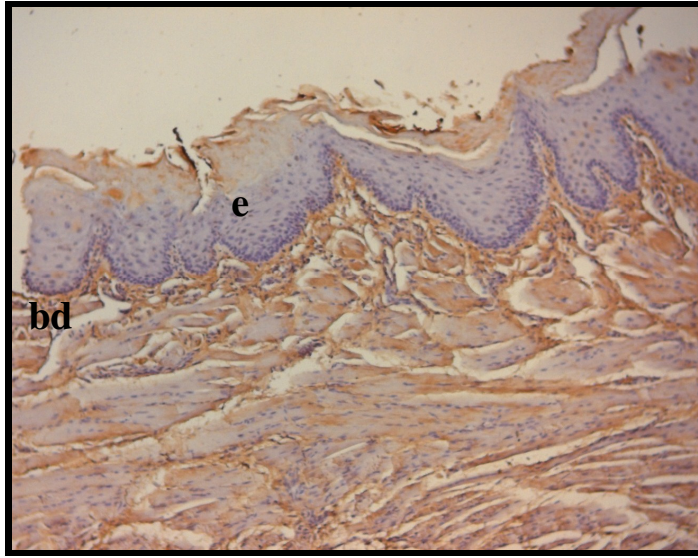
**Resim 23 (a).** Grup 2'ye ait çok katlı yassı epitelde (e) hem stoplazmik hem de yoğun nükleer (oklar) IL-1 $\beta$  boyanması görüntüsü (x100, DAB).



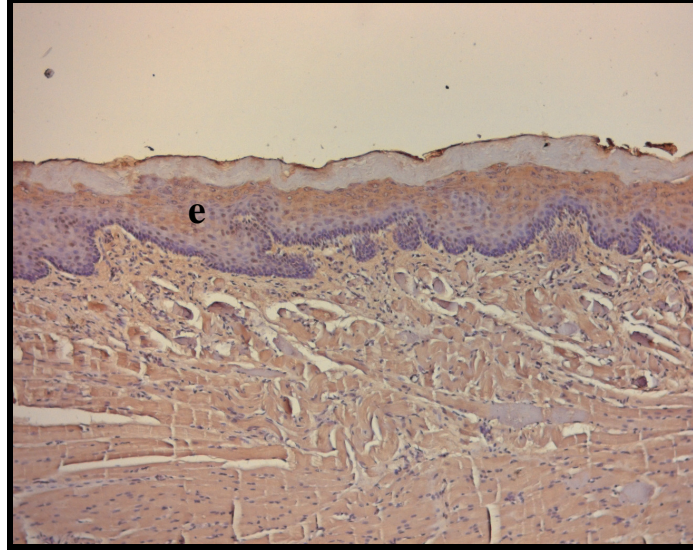
**Resim 24 (b).** Grup 2'ye ait doku derinliklerinde inflamatuvar hücrelerde ve endotelilerde IL-1 $\beta$  pozitifliği görüntüsü (x200, DAB).



**Resim 25. Grup 3'e ait bağ doku hücrelerinde ve keratinositlerde nükleer IL-1 $\beta$  pozitifliği (ok) görüntüsü (x200,DAB).**



**Resim 26. Grup 4' e ait epitelde (e)ve bağ doku (bd)hücrelerinde IL-1 $\beta$  ekspresyonunun izlenemediği bir örnek görüntü (x100, DAB).**

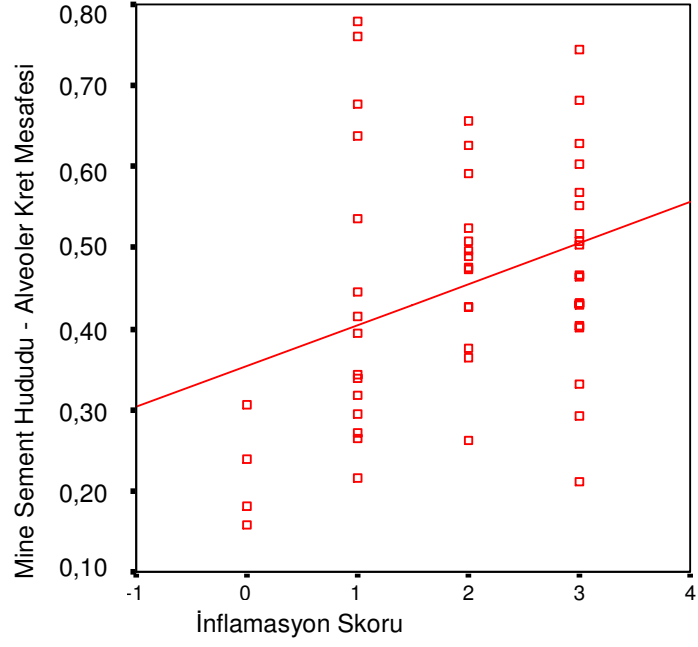


**Resim 27.** Grup 5'e ait çok katlı yassı epitelde (e) zayıf izlenen IL-1 $\beta$  pozitifliği görüntüsü (x100, DAB).

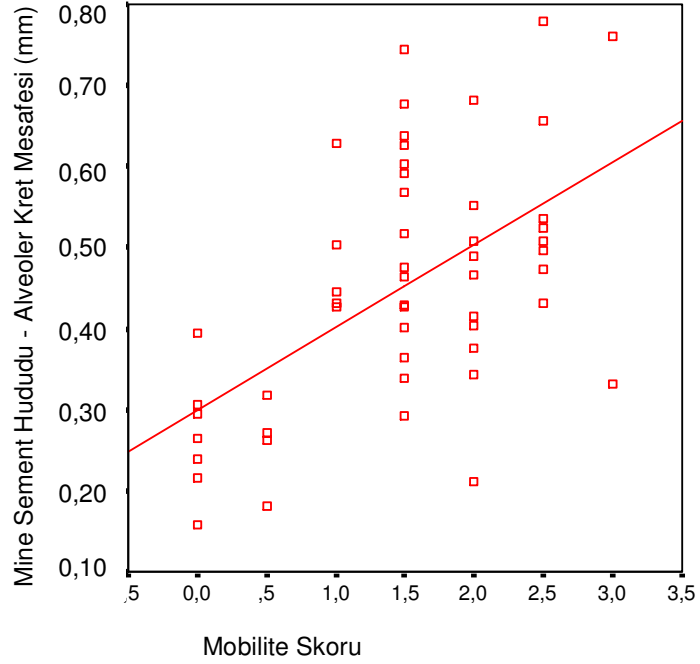
MMP-9 ile IL-1 $\beta$ , alveoler kemik kaybı ile inflamasyon, mobilite ile inflamasyon, alveoler kemik kaybı ile mobilite arasında pozitif korelasyon tesbit edilmiştir.

**Tablo 8.** Mine Sement Hududu – Alveoler Kret Mesafesi ile Enflamasyon, MMP 9, MMP 2, IL-1 $\beta$  Ekspresyon Skorları ve Mobilite skorları Arasındaki Korelasyon Katsayıları ve Önemlilik Düzeyleri

Değişkenler	Rho	P
İnflamasyon	0.319	<b>0.021</b>
MMP-9	0.067	0.642
MMP-2	0.014	0.922
IL-1 $\beta$	0.047	0.745
Mobilite	0.504	<b>&lt;0.001</b>



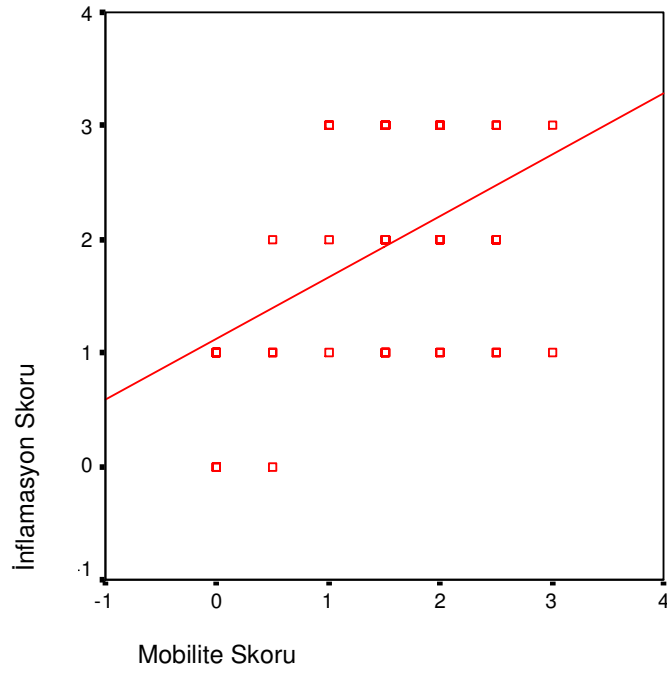
**Şekil 13.** Mine Sement Hududu – Alveoler Kret Mesafesi ile İnflamasyon Skoru Arasındaki Saçılım Grafiği



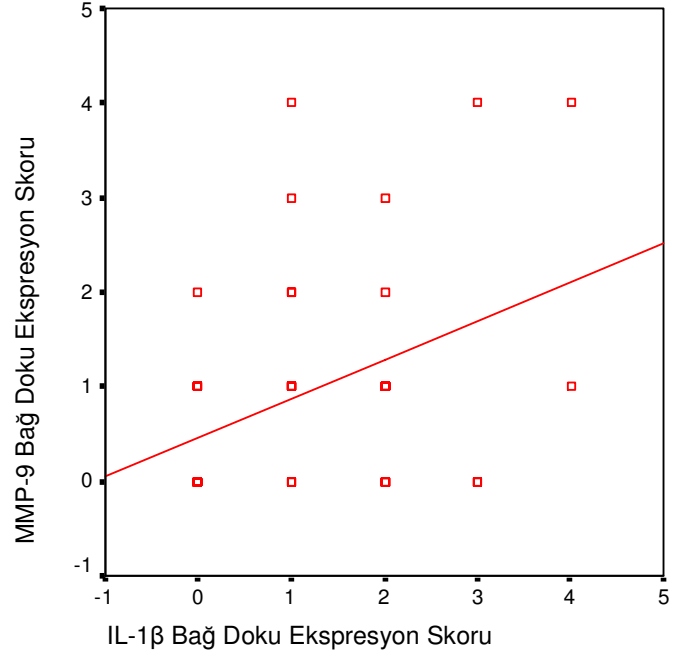
**Şekil 14.** Mine Sement Hududu – Alveoler Kret Mesafesi ile Mobilite Skoru Arasındaki Saçılım Grafiği

**Tablo 9.** İnflamasyon, MMP-9, MMP-2, IL-1 $\beta$  Bağ Doku Skorları ve Mobilite Düzeylerinin Birbiri Arasındaki Korelasyon Katsayıları ve Önemlilik Düzeyleri

Değişkenler		MMP-9	MMP-2	IL-1 $\beta$	Mobilite
İnflamasyon	<i>rho</i>	-0.017	0.122	0.188	0.360
	<i>p</i>	0.905	0.395	0.185	<b>0.009</b>
MMP-9	<i>rho</i>		-0.115	0.418	-0.035
	<i>p</i>		0.420	<b>0.002</b>	0.806
MMP-2	<i>rho</i>			0.207	0.053
	<i>p</i>			0.145	0.710
IL-1 $\beta$	<i>rho</i>				0.225
	<i>p</i>				0.113



**Şekil 15.** İnflamasyon ile Mobilite Skorları Arasındaki Saçılım Grafiği



**Şekil 16.** MMP-9 İle IL-1β Bağ Doku Ekspresyon Skorları Arasındaki Saçılım Grafiği

## TARTIŞMA

Diabetes Mellitus prevalansı dünya çapında artmakta olan hiperglisemi ile karakterize metabolik bir hastalıktır. Dünya sağlık örgütünün yaptığı değerlendirmeye göre diabetik hastaların sayısının 2025 yılında 300 milyon kişiye ulaşabileceği bildirilmiştir.<sup>197</sup>

Diabetin, periodontal hastalık için bir risk faktörü olduğunu öne süren çalışmalar bulunmaktadır.<sup>13,22,40,46</sup> Bu ilişkiyi açıklamaya yönelik çalışmalarda nötrofillerin bozulmuş cevapları<sup>16-20</sup>, lipopolisakkaritlere karşı aşırı cevap gibi konak yanıtındaki değişiklikler<sup>37,38</sup>, artan TNF- $\alpha$  üretimi<sup>36,62</sup>, kolajen sentezinde azalma ve kolajenaz aktivitesinde artış sebep gösterilmiştir.<sup>87,88</sup> Ayrıca çalışmalarda AGE'lerin bazı hücrelerin fenotipini RAGE aracılığıyla değiştirebileceği bildirilmiştir. Bu reaksiyon makrofajları proinflamatuvar sitokinler üreten yıkıcı enzimlere dönüştürebilmektedir.<sup>76,83,84</sup> Diabetik bireylerde periodontal hastalıkların daha sık ve şiddetli şekilde ortaya çıktığını bildiren bir çok çalışma bulunmaktadır.<sup>40,52,198</sup> Diabet ve periodontal hastalık arasındaki ilişkinin çift yönlü olduğu düşünülmektedir. Periodontal hastalığın diabetin metabolik durumu üzerine belirgin etkisinin olduğunu<sup>12,68</sup> ve diabetik bireylere uygulanan periodontal tedavinin glisemik kontrolde iyileşme sağlayabileceği öne sürülmüştür.<sup>60,92,199</sup> Bu sebeple periodontal enfeksiyonun kontrolü diabetik hastalarda büyük önem kazanmaktadır. Bu bilgiler ışığında diabet ve periodontitis arasındaki bu önemli ilişkileri değerlendirdiğimizde çalışmamızı deneysel diabet ve periodontitis modelleri üzerinde gerçekleştirmeyi planladık.

Deneysel periodontitis ve diabet çalışmalarında ratlar küçük hayvanlar olmaları, fazla sayıda hayvanla çalışma şansı, kolay elde edilebilir ve bakımlarının kolay olması, yaşama karşı dayanıklı ve düşük maliyette olmaları sebebiyle en çok kullanılan deney hayvanlarıdır.<sup>90,200</sup>

Ratların herbir yarım çenesinde 1 kesici ve 3 molar diş bulunmaktadır.<sup>200</sup> Ratları periodontal açıdan incelediğimizde; molar bölgedeki periodontal dokularının, oral gingival epitel, oral sulkuler epitel, bağlantı epiteli, periodontal kolajen fibriller, hücreli-hücretsiz sement ve alveol kemiği açısından insan periodonsiyumuna çok benzediği belirtilmiştir. Aralarındaki tek fark gingival sulkuler epitelin ratlarda keratinize olmasıdır.<sup>201</sup>

STZ diyabetojenik özelliği olan dar spektrumlu bir antibiyotiktir. Antibiyotik olmasına rağmen neoplastik ve bağışıklığı baskılayıcı ilaçlar olarak kullanılır (literatür). STZ, pankreastaki insülin salgılayan  $\beta$  hücrelerinde toksik etkisi nedeniyle tip 1 diabet için hayvan modeli oluşturmada sıklıkla kullanılan kimyasal bir ajandır.<sup>202</sup> STZ nin langerhans adacıklarında seçici olarak  $\beta$  hücrelerini etkileyip diabet oluşturduğu anlaşıldıktan sonra yapılan bir çok deneysel hayvan çalışmasında STZ kullanılmaktadır.<sup>138,203</sup> STZ' nin diyabetojenik etki mekanizması için en fazla benimsenen teori, reaktif oksijen radikallerinin (ROS) salınımıyla ilgilidir. Ortama salınan ROS'lar DNA kırılımına neden olur ve DNA'yı tamir amacı ile aktive olan poli (ADP-riboz) sentetaz enziminin intraselüler nikotinamid adenin dinükleotid (NAD)' in moleküllerini kullandığı ve  $\beta$  hücrelerinde NAD düzeyinin patolojik sınırlara inmesinin hücreyi nekroza götürdüğü bildirilmektedir.<sup>204</sup> Bizim çalışmamızda deneysel diabet oluşumu sağlamak amacıyla tüm ratlara 50 mg/kg'lık tek doz halinde sitrat tamponu içinde çözülen STZ intraperitoneal olarak enjekte edilmiş ve diabet oluşumu için 10 gün beklenilmiştir.<sup>190,191</sup> STZ nin kullanım dozu, hazırlanışı ve enjeksiyon yöntemini belirlerken daha önceki yapılan çalışmalardan yararlanılmıştır.<sup>190,191</sup>

Ratlarda deneysel periodontitis oluşumunu sağlayacak çeşitli metodlar bildirilmiştir. Bunlar, periodontopatojenlerin veya LPS' lerin oral veya gingival dokulara aşılması ve molar dişler bölgesine ligatür yerleştirilmesidir ve (Literatür) çalışmalarda farklı metodların birbirine

üstünlüğü kanıtlanmamıştır. Ligatür modeli ile molar dişlerin çevresine yerleştirilen sütür materyalleri ile çevre değişikliği yaratılıp bakterilerin üremesi sağlanarak periodontal yıkım gerçekleştirilmektedir.<sup>90</sup> Periodontal kemik kaybı ratlarda oldukça hızlı şekilde oluşmakta ve daha önceki çalışmalarda bildirildiği üzere alveoler kemik kaybı, ligatürle deneysel periodontitis modeli oluşturulduktan 3 gün sonra belirgin olarak artmakta ve 7. günde maksimum seviyeye ulaşmaktadır.<sup>160,192,194</sup> Bu görüşlerin doğrultusunda çalışmamız, Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Etik kurulunun izni dahilinde ratlar üzerinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda hormonal değişimleri sabit tutmak için erkek ratlar kullanılmış ve deneysel periodontitis modeli oluşturmak amacıyla daha önceki çalışmalarda kullanılan 3.0 ipek sütür 2. molar dişlerin servikal bölgelerine yerleştirilmiştir.<sup>160,192,194</sup> 1 hafta sonra ligatürle deneysel periodontitis oluşumuna bağlı olarak ratların dişeti dokularında ödem, kızarıklık, kanama ve dişlerde mobilite gibi klinik belirtiler gözlenmiştir.

Periodontitis gibi inflamatuvar hastalıklarda görülen doku yıkımında MMP' ların önemli rollerinin bulunduğu saptanmıştır.<sup>111</sup> MMP'lar arasından jelatinazlar, Tip IV, V, VII, X, XI kolajen, jelatin, elastin, proteoglikan kor proteinleri, fibronektin gibi ekstraselüler matriks komponentlerini yıkma özelliğine sahiptirler. Bu grupta tip A ve tip B olmak üzere iki alt grup mevcuttur: Tip A jelatinaz, 72 kDa olup MMP-2 olarak adlandırılmaktadır ve başta fibroblastlar olmak üzere keratinositler, endotel hücreleri, kondrositler, osteoblastlar, monositler gibi pek çok değişik hücre tarafından üretilmektedir.<sup>109,110,122</sup> Tip B jelatinaz ise 92 kDa olup MMP-9 olarak adlandırılmaktadır ve PMNL, makrofaj, keratinositlerden eksprese olmaktadır.<sup>205</sup> Konuyla ilgili yapılan literatür taramalarında dişeti dokusunda MMP-2 ve -9 seviyelerinin tespiti ile ilgili çok az çalışma ve farklı sonuçlar bulunduğu görülmektedir.

MMP-2 ve -9'un deneysel diabet ve periodontitis oluşturulan ratlarda dişetindeki ekspresyon seviyelerini belirleyerek bu enzimlerin diabette görülen periodontal hastalık patogenezindeki rollerini incelemek ve KMT ajanlarından klodronat ve SDD'nin MMP ekspresyonları üzerine etkilerini araştırmak amacıyla çalışmamızda dişeti dokusundaki MMP-2 ve -9 seviyeleri araştırılmıştır. IL-1 $\beta$ ; monosit/ makrofajlar, PMN'ler, epitel hücreleri, keratinositler, fibroblastlar, B lenfositler, osteositler tarafından da üretilen sitokinlerdir.<sup>99</sup> Yapılan çalışmalarda periodontal hastalıklarda DOS<sup>130,131</sup> ve periodontal dokularda IL-1 $\beta$  seviyesinin arttığı<sup>132,133</sup> ve hastalık şiddeti ile IL-1 $\beta$  seviyesi arasında da korelasyon olduğu tespit edilmiştir.<sup>107,108</sup> Diabetik bireylerde sağlıklı bireylere göre periodontal inflame dokularda ve DOS ta, IL-1 $\beta$  düzeylerinde artış gözlenmiştir.<sup>63,64</sup> Diabette görülen monosit/makrofaj fenotipinde oluşan değişiklik IL-1 $\beta$  gibi proinflamatur sitokinlerde artışa neden olmakta ve periodontal hastalıkların patogenezinde önemli bir rol oynamaktadır.<sup>76,83,84</sup> Bu sebeple çalışmamızda klodronat ve doksisisiklinin IL-1 $\beta$  seviyeleri üzerine etkileri değerlendirilmiştir.

Bifosfonatlardan klodronat osteoklast kaynaklı kemik rezorpsiyonunun kuvvetli inhibitörüdür ve klinik olarak paget hastlığı, osteoporoz gibi metabolik kemik hastalıklarının tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır.<sup>129,169</sup> Kemik rezorpsiyon inhibisyonunun dışında klodronatın anti-enflamatur özellikleri de gösterilmiştir.<sup>194</sup> Klodronat.....Tetrasiklinlerin diabetik ratlarda kolajen formasyonunu normalize ettiği ve kolajenazlar gibi MMP'lerin üretimini azalttığı gösterilmiştir.<sup>88,89</sup> Tetrasiklinler arasında doksisisiklinin, güçlü anti-kolajenaz özelliğe sahip olduğu belirlenmiştir.<sup>25,157</sup> Bu bilgiler ışığında çalışmamızda tedavi uygulaması amacıyla KMT ajanlarından klodronat ve SDD kullanılmıştır.

Çalışmamızda birinci jenerasyon bifosfonat olan klodronat 7 gün boyunca günde 1 defa subkutan olarak 25mg/kg dozunda enjekte edilmiştir. Bifosfonatların oral kullanımında ilacın biyoyararlanımının %1-%10 arasında<sup>129</sup> olması sebebiyle çalışmamızda subkutan uygulamayla kontrollü bir doz verilmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızda 7 gün boyunca günde 1defa oral yola 6mg/kg doksisisiklin içeren 1 ml karboksimetilselüloz verilmiştir. Bu ilaçların kullanım şekilleri ve dozları literatür bilgileri doğrultusunda belirlenmiştir.<sup>193,194</sup>

Makela ve arkadaşları<sup>205</sup> erişkin periodontitisli ve sağlıklı bireylerden aldıkları dişeti örneklerini jelatin zimografi yöntemi ile değerlendirmiş, periodontitisli hastalarda sağlıklı bireylere göre MMP-9 ve -2 seviyelerinde artış gözlemlemiş ve MMP-9' un örneklerde izlenen baskın jelatinaz formu olduğunu bildirmişlerdir. MMP-9 aktivitesinin çoğunlukla hastalıklı bölgelerde olduğunu ve bu enzimin gingival keratinositler ve PMN' lerden eksprese edildiğini bildirmişlerdir. MMP-2 ise hastalıklı bölgelerin sadece yarısında saptanmış, sağlıklı bireylerden alınan dokularda saptanmamıştır. MMP-2 ekspresyonu daha çok dişeti bağ dokusu ve fibroblastların bulunduğu bölgelerdeki granülasyon dokularında görülmüştür. Periodontal tedavi sonrası bu bireylerdeki jelatinaz aktivitesinin düştüğü bildirilmiştir. Materyal ve yöntem olarak çalışmamızla bu çalışma arasında farklılıklar bulunmasına rağmen bu çalışmanın MMP-2 bulguları ile paralel olarak çalışmamızda da periodontitisli tüm gruplarda MMP-2 ekspresyonunun saptanabilir seviyenin altında kaldığı görülmüş ve MMP-9 ekspresyonunun bu çalışma sonucuyla benzer şekilde dominant olarak PMNL' lerden eksprese olduğu ve inflame dokularda gözlenen baskın jelatinaz formunun MMP-9 olduğu izlenmiştir.

Achong ve arkadaşlarının<sup>122</sup> ratlar üzerinde yaptıkları deneysel bir çalışmada birinci grupta ligatürle periodontitis oluşturulmuş, ikinci kontrol grubunda ise bir işlem uygulanmamıştır. Takiben 7. ve 21.

günlerde ratlar sakrifiye edilip dişeti dokusu örnekleri alınmıştır. Ligatürleme sonrası 7. günde epitelyal ülserasyon, PMN infiltrasyonu ve bağ doku bütünlüğünün bozulmasını içeren akut inflamasyon tesbit edilmiştir. 21. günde yapılan histolojik incelemelerde sulkuler epitelin inflame bölgelere, JE'in ise apikale doğru migre olduğu ve PMN infiltrasyonunun da görülmediği bulgulanmıştır. Histomorfometrik analizle 21. günde alveoler kemik kaybı değerlendirilmiş ve kontrol grubu ile deneysel periodontitis oluşturulan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). Jelatin zimografi yöntemi sonucu aktif MMP' ların yanında pro-MMP' larda belirlenebilmiş ve kontrol grubunda zayıf aktif MMP-2 (68kDa) bandı gözlenmiştir. Ligatürle deneysel periodontitis oluşturulan gruba ait dişeti örneklerinde ise 7. ve 21. günlerde latent MMP-2 (72kDa) ve düşük moleküler ağırlıklı olgun ve aktif MMP-2 (68kDa) artışı gözlenmiştir. Çalışmamızda bu çalışmaya paralel olarak ligatürle deneysel periodontitis oluşumu için 7 gün beklenilmiştir. 7. günde bizim çalışmamıza benzer olarak akut inflamasyon bulguları gözlemlenmiştir. Bizim çalışmamızdaki 7 günlük kemik kaybı değerlendirilmesine rağmen deneysel periodontitis oluşturulan grubumuzla kontrol grubumuz arasındaki fark bu çalışmaya benzer olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). Bu çalışmada zimografi metodu kullanılarak aktif ve latent jelatinaz formları ayırt edilebilmiş fakat istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç verilmemiştir. Bizim çalışmamızda ise hücre boyanma değerlendirilmiştir. MMP-2 enziminin hücre içindeki ekspresyonundan çok hücre dışındaki aktivitesi bu farklılığa rol oynayabilir. Farklı çalışma sonuçlarının sebebi immünohistokimyasal çalışmaların MMP antikörlerine veya kullanılan tekniğe karşı düşük seviyede hassasiyeti olmasından kaynaklanabilir.

Golub ve arkadaşları<sup>113</sup> 5 erişkin periodontitisli bireyden periodontal cerrahi sırasında alınan inflame dişeti örneklerinde kolajenaz aktivitesinin incelenmesi için SDS-PAGE / fluorografi / laser densitometri,

jelatinaz aktivitesinin değerlendirilmesi için de jelatin zimografi yöntemi kullanmışlar ve inkübasyon karışımına doksisisiklin eklemişlerdir. Araştırmacılar erişkin periodontitisli bireylerin gingival dokularındaki jelatinolitik aktivitenin MMP-2 den çok MMP-9 dan kaynaklandığı bildirmişlerdir. Periodontitisli bireylerden alınan örneklerde az sayıda MMP-2 formu tespit edilirken temel olarak MMP-9 formu saptanmıştır. Araştırmacılar inflame gingival dokulardaki MMP'lerin gingival hücrelerden (fibroblast ve epitelyal hücreler) veya monosit/ makrofajlardan çok PMN'lerden kaynaklandığını ve PMN kaynaklı MMP'lerin aktivitesinin doksisisiklin ile inhibe edilebileceğini bildirmişlerdir. Bu araştırmanın denek sayısı az ve istatistiksel analiz yapılmamış olmasına rağmen çalışmanın sonuçları ile paralel olarak bizim çalışmamızda da alınan dişeti dokularında MMP -9 dominant formdur, MMP-2 formu saptanmamış ve doksisisiklin kullanımı MMP-9 ekspresyonunu azaltmıştır

Ramamurthy ve arkadaşlarının<sup>193</sup> çalışmasında *Escherichia coli* endotoksini enjeksiyonu ile deneysel periodontitis oluşturulmuş ratlarda aynı gün KOMT-1,-3,-4,-7,-8 ve doksisisiklin 7 gün boyunca oral yolla 1ml karboksimetilselüloz içinde günde 2 mg olarak verilmiştir. Salin grubu kontrol olarak kullanılmıştır. 7. günde ratlar sakrifiye edilip çenelerde histomorfometrik inceleme ile alveoler kemik kaybı değerlendirilmiş ve immünohistokimyasal analiz yapılmıştır. İmmünohistokimyasal analizde 0 ile 4 arasında skorlar kullanılmıştır (0=boyanma yok, 4=4-6 hücrede pozitif boyanma var) ve IL-1 $\beta$ , MMP-2, -9 ekspresyonu sadece salin, LPS, LPS+KOMT-1 ve LPS+KOMT-4 gruplarında değerlendirilmiştir. IL-1 $\beta$  ekspresyonunda LPS grubunda (1.0 $\pm$ 0.2) salin grubuna (0) göre artış, LPS+ KOMT-1 (0) ve LPS+ KOMT-4 (0.5 $\pm$ 0.2) gruplarında ise azalma gözlenmiştir. MMP-9 ekspresyonunda LPS grubunda (3.0 $\pm$ 0.4) salin grubuna (0.9 $\pm$ 0.3) göre artış, LPS+ KOMT-1 (1.0 $\pm$ 0.2) ve LPS+ KOMT-4 (2 $\pm$ 0.4) gruplarında ise azalma gözlenmiştir. MMP-2 ekspresyonları salin (1.8 $\pm$ 0.5) ,LPS (2.0 $\pm$ 0.3), LPS+KOMT-1

(2.0±0.6) ve LPS+KOMT-4 (2.0±0.3) gruplarında benzer bulunmuştur. Histomorfometrik analizde LPS grubunda salin grubuna göre belirgin kemik kaybı gözlenmiştir (p<0,01). KOMT-8, 1, 3 ve doksisisiklin kullanımı kemik kaybını endotoksin grubuna göre belirgin oranda düşürmüşlerdir(p<0,01). Materyal ve yöntem olarak çalışmamızla bu çalışma arasında farklılıklar bulunmasına rağmen çalışmamızda bu çalışmaya paralel olarak histomorfometrik olarak periodontitis grubunda kontrol grubuna göre belirgin kemik kaybı görülmüştür. Çalışmamızda doksisisiklin kullanımı kemik kaybını azaltsada istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. Bunun sebebi çalışmamızda periodontitis oluşumunda 1 hafta sonra ilaç kullanılması yani küratif amaçlı olması bu çalışmada ise profilaktik ilaç kullanılması olabilir. Bu çalışmada çalışmamıza paralel olarak doksisisiklin tedavisi oral yolla 1 hafta süreyle kullanılmıştır. Çalışmada doksisisiklin tedavisinin imünohistokimyasal sonuçları verilmemiş sadece KOMT-1 ve 4 değerlendirilmiş ve istatistiksel anlamlı değerler de açıklanamamıştır. Bu çalışmayla paralel olarak bizim çalışmamızda da MMP-2 ekspresyon seviyesinin düşük olduğu bulgulanmış ve gruplar arası karşılaştırma yönünden de bir fark bulunamamıştır. Bu çalışmanın MMP-9 ve IL-1β ekspresyonları sonuçları ile paralel olarak çalışmamızda da periodontitis oluşturulan grupta kontrol gruplarına göre anlamlı bir artış bulunmakta ve doksisisiklin kullanımı ile bu parametrelerde azalma gözlenmektedir. Bununla birlikte önceden de belirtildiği gibi çalışmamızla diğer çalışmalar arasında kesin bir karşılaştırma yapabilmek oldukça zordur çünkü çalışmamız tümüyle diabetik ratlar üzerinde gerçekleştirilmiştir.

Silva ve arkadaşları<sup>206</sup> ligatürle deneysel periodontitis (10 gün beklenecek) ve STZ enjeksiyonu (65mg/kg) ile diabet oluşturdukları 78 ratta dişeti MMP-2, MMP-9 ekspresyonlarını değerlendirmişlerdir. Ratlar normal ve diabetik olarak 2 gruba ayrılmış ve deneysel periodontitis oluşumundan 0, 15 ve 30 gün sonra alınan dişeti,

dokuları immünoflorosans, zymografi ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak MMP-2 ve -9' un inflame dokularda tesbit edildiği bildirilmiş olup MMP-2 nin latent (72kDa), intermediate (68kDa) ve aktif (62kDa) formlarının miktarları normal ratlarda diabetiklerden daha fazla bulunmuştur. Hem normal hemde diabetiklerde bu 3 MMP-2 formu inflamasyonun 15. günden sonra kısa süreli bir artış göstermiş, 30. günde ise azalma eğilimi göstermiştir. MMP-9 aktivitesinde MMP-2 ye benzer bulunmuş, enflamasyonun 15. günün den sonra geçici bir artış gözlenmiştir. MMP-9 aktivitesi diabetik ratlarda belirgin oranda düşük bulunmuş ama inflamasyon sırasında diabetik ratlarda, non inflame diabetik ratlara göre MMP-9 aktivitesinde yaklaşık 13 katlık artış gözlenmiştir. Diabetik hayvanlarda inflamasyon süresince görülen yüksek MMP-9 aktivitesi bizim çalışmamızla paralellik göstermektedir. Bizim çalışmamızda da MMP-9 seviyesi inflamasyonla artış göstermiş tersine MMP-2 aktivitesi inflamasyon süresince diabetik hayvanlarda düşük bulunmuştur. Bunun sebebi bilinmemekte fakat bazı mediyatörlerin diyabette MMP-2 ekspresyonunu azaltacak şekilde düzenlediği veya bu durumun enzim ve onun inhibitörleri arasındaki dengesizliği yansıtmış olabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca çalışmamızdaki dişeti MMP-2 ekspresyonu bu çalışmadan farklı olarak 7. günde değerlendirilmiştir ve MMP-2 ekspresyonundaki düşüklüğün süreyle de ilgili olabileceği fikrini doğurmuştur. Araştırmacılar normal ve diabetik ratların dişeti dokularında bulunan stokin profillerindeki farklılıkların diyabette inflamasyon sırasında jelatinazların ekspresyon ve aktivitesindeki değişikliğe sebep olabileceğini bildirmişlerdir.

Ryan ve arkadaşlarının<sup>138</sup> Sprague - Dawley ratlar üzerinde yaptıkları çalışmada hayvanlar her grupta 5-7 rat olacak şekilde gruplandırılmış, tüm ratlara STZ enjeksiyonu sonrası 3 hafta süreyle oral yolla günde 15mg/kg KOMT-1, KOMT-3 KOMT-4, KOMT-5 KOMT-7, KOMT-8 veya doksisisiklin verilmiştir. Ratlar 3 hafta sonra sakrifiye edilmiş

ve deri örnekleri alınmıştır. KOMT-5 dışındaki tüm tedavi gruplarındaki diabetik ratlarda total deri jelatinaz ve kolajenaz aktivitesi normalize olmuştur ( $p < 0,001$ ). Enzimografi sonucu diabetik dokulardaki artmış jelatinaz aktivitesinin çoğu 92 kDa'lık MMP-9 formu olarak tesbit edilmiş, 72kDa'lık MMP-2 ise tesbit edilebilir seviyenin hafifçe üstünde bulunmuştur. Bu çalışmada bizim çalışmamızdan farklı olarak enzimografi yöntemi kullanılmasına rağmen diabetik ratlarda MMP-2 seviyesi normal seviyelerin hafif üzerinde bulunmuş fakat istatistiksel olarak analiz yapılmamıştır. Bu çalışma diabetik ratlarda patolojik olarak artmış MMP'nin oral yolla kullanılan doksisisiklin veya KOMT tedavisi ile normalize edilebileceğini göstermiştir. Bizim çalışmamızda da bu çalışmayla paralel olarak diabetik ratların yumuşak dokularındaki MMP-9 seviyelerinde artış görüldüğü, doksisisiklin tedavisi sonucu ise azalma olduğu bulgulanmıştır.

Literatür taramalarımızda deneysel periodontitis ve diabet oluşturulan ratlarda doksisisiklin ve klodronat kullanımının MMP-2 ve -9 üzerine etkisini inceleyen bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Dolayısıyla çalışmamızla diğer çalışmalar arasında yapılan karşılaştırmalar sadece değerlendirme amacıyla kullanılmış benzer yöntemlerin seçilerek alındığı sonuçlar ile yapılabilmektedir. Çalışmamızda diabetik ratlarda inflamasyon oluşumuyla dişeti bağ dokusu MMP-9 ekspresyon skorlarında anlamlı oranda artış gözlenmiştir. Doksisisiklin, bifosfonat ve kombine tedavinin ise inflamasyon sonrası artmış MMP-9 seviyelerini azalttığı, hatta 'normalize' ettiği gözlenmiştir. İlaç tedavisi uygulanmış ratlarda MMP-9 ekspresyonunda belirgin inhibisyon saptanmıştır. Bu durum doksisisiklin ve bifosfonatların MMP-9 üretimini kontrol ederek bağ doku yıkımını azaltabileceğini gösterebilir. MMP-2 bağ doku ekspresyon skorları arasında ise gruplar arası farka rastlanılmamıştır. Bunun sebebi bilinmemesine rağmen çalışmamızın akut inflamasyonu değerlendirmesi ve bu dönemde inflame gingival dokulardaki MMP'lerin gingival hücrelerden (fibroblast ve epitelyal hücreler) veya monosit/ makrofajlardan

çok PMN'lerden kaynaklanması sebep olabilir. MMP'lerin bağ dokusundan ekspresyonu ve inhibisyonu arasındaki denge çeşitli sitokinler, büyüme faktörleri ve hormonları içeren kompleks etkileşimlerle sağlanmaktadır. Diabette bu mediatörlerin dengesinde görülen farklılıklar MMP ekspresyonunda değişikliklere sebep olabilir.

Duarte ve arkadaşları<sup>207</sup> diabetik ve kronik periodontitisli hastaların dişeti dokularındaki sitokin seviyelerini değerlendirmişler ve IL-1  $\beta$  ve IL-6'nın artan ekspresyonunun diabetik periodontal inflamasyonlu hastalarda non diabetik periodontitisli hastalara göre daha fazla olduğunu bildirmişlerdir ( $p < 0,05$ ). Artmış olan sitokin ekspresyonunun diabetli bireylerde periodontal yıkımın daha fazla görülmesine sebep olabileceği bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda da bu çalışmayla paralel olarak diabet ve periodontitis grubunda IL-1 $\beta$  seviyeleri yüksek bulunmuştur.

Anderson ve arkadaşları<sup>208</sup> deneysel diabet ve ligatürle periodontitis oluşturulmuş ratlar ve sadece diabet oluşturulmuş ratlardan alınan epididymal adipose dokularda IL-1  $\beta$ 'nin %25 arttığını ( $p < 0,05$ ) ve histomorfometrik analizde diabet + periodontitis grubunda ( $0.59 \pm 0.2$ mm), diabet grubundan ( $0.37 \pm 0.1$ mm) daha fazla alveoler kemik kaybı ( $p < 0,01$ ) gözlendiğini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da bu çalışmadan farklı olarak dişeti dokuları incelenmiş ve bu çalışmayla paralel olarak diabet+periodontitis oluşturulan grupla diabet grubu arasında dişeti IL-1  $\beta$  seviyeleri açısından belirgin fark bulunmuştur ( $p < 0,01$ ). Ayrıca benzer histomorfometrik yöntem kullanılmış ve diabet+periodontitis grubunda ( $0.54 \pm 0.15$ mm), diabet grubundan ( $0.26 \pm 0.06$ mm) daha fazla alveoler kemik kaybı gözlenmiştir ( $p < 0,05$ ).

Weinreb ve arkadaşları<sup>183</sup> bifosfonatlardan alendronatın, maymunlarda deneysel periodontitis oluşumuna bağlı gelişen alveoler kemik kaybı üzerine etkisini histomorfometrik olarak değerlendirmişlerdir. 27 maymun deneysel periodontitis oluşumundan sonra 3 gruba ayrılmış; 1. gruba salin, 2. gruba 0,05mg/kg alendronat, 3. gruba 0,25 mg/kg alendronat intravenöz olarak 2 haftada bir defa 16 hafta süresince enjekte edilmiştir. Ligatür yerleştirilmeden 1 hafta önce ilaç tedavisine başlanılmıştır. Karşıt çenedeki ligatüre edilmemiş dişler kontrol grubu olarak kabul edilmiştir. Salin uygulanmış grupta belirgin kemik kaybı gözlenmiş, 0,05 mg/kg alendronat kemik kaybını belirgin oranda azaltmış, 0,25mg/kglık alendronat tedavisinin ise furkasyon bölgesindeki alveoler kemik kaybını azaltmakta etkisiz olduğu, mine-sement birleşim bölgesinde de hafif etkili olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada bizim çalışmamızdan farklı olarak profilaktik doz ve uzun süreli intravenöz bifosfonat uygulanmış olmasına rağmen bu çalışmayla paralel olarak çalışmamızda bifosfonat kullanılmayan gruba göre bifosfonat kullanımı alveoler kemik kaybını azaltmış fakat bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Rocha ve arkadaşları<sup>209</sup> 40 diabetik hastaya 6 ay boyunca günde 10 mg alendronat veya plasebo tedavisi uygulamış ve alveoler kemik sınırı ile mine-sement hududu arası mesafe dijital radyografiyle değerlendirilmiştir. Ayrıca kemik rezorpsiyonun biyokimyasal belirteçleri olan idrar N-telopeptid (Ntx) seviyeleri, diabetin metabolik kontrolü ve klinik parametreler başlangıç ve 6 ay sonra değerlendirilmiştir. İki grubada mekanik tedavi ve oral hijyen uygulamaları yapılmıştır. Sonuç olarak başlangıçta ve 6 ay sonra gruplar arasında diabetin metabolik durumu açısından fark bulunamamış fakat periodontal tedavi sonrasında iki grupta başlangıca göre kan glukoz seviyesi ve HbA1c değerlerinde azalma gözlenmiştir. Ntx belirteçinde de tedavi grubunda belirgin azalma (P=0,006) periodontal parametrelerde 2 grupta düzelme gözlenmiş fakat tedavi grubunda daha iyi sonuçlar alınmıştır. Alveoler kemik - mine-

sement sınırı arası mesafe kontrol grubunda artarken alendronat grubunda azalmıştır (P=0,0003). Bu çalışma diabetik dokularda bifosfonatın etkinliğini inceleyen tek çalışmadır. Bu çalışmaya paralel olarak bizim çalışmamızda da bifosfonat kullanımı sonrasında alveoler kemik kaybında azalma gözlenmiştir fakat fark anlamlı bulunmamıştır. Bu durum ilacın kullanım süresi ve şeklindeki farklılıklar ve çalışmanın insanlarda planlanmış olmasından kaynaklanabilir.

Alencar ve arkadaşlarının<sup>194</sup> çalışmasında 72 erkek wistar ratta ligatürle deneysel periodontitis modeli oluşturulmuş, klodronatın kemik rezorpsiyonu ve inflamatuvar parametreler üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Küratif klodronat grubunda ligatür yerleştirilmesinin 5. gününde 1, 5, 25 mg/kg dozlarında subkutan klodronat enjeksiyonlarına başlanılmış , ilaç 7 gün enjekte edildikten sonra 11. günde sakrifikasyonlar yapılmıştır. Sonuç olarak küratif klodronat grubunda 1, 5 ve 25mg/kg lık dozlarda tedavi edilmeyen gruba kıyasla alveoler kemik kaybı sırasıyla %20, %62 ve %69 olarak bulunmuştur. Küretif gruplarda hem 5 hemde 25mg/kglık dozların kullanımı tedavi edilmemiş gruba göre belirgin olarak alveoler kemik kaybında azalma sağlamıştır (p<0,05). Histolojik değerlendirmede inflamatuvar hücre akümülyasyonu ve osteoklast sayısının 25mg/kg uygulanan küratif grupta tedavi edilmemiş gruba göre anlamlı miktarda daha az olduğu gözlenmiştir (p<0,05). Bizim çalışmamızda da bifosfonat grubunda inflamasyon düzeyinde ve alveoler kemik kaybında düşüş gözlenmiş fakat fark anlamlı bulunamamıştır. Çalışma sonuçları arasındaki farklılıklara, bu çalışmada bizim çalışmamızdan farklı olarak yüksek dozda klodronat kullanılması ve ayrıca çalışmamızdaki tüm grupların diabetik ratlardan oluşmasının sebep olabileceğini düşünmekteyiz.

Llavaneras ve arkadaşları<sup>195</sup> E. coli endotoksini ile deneysel peridontitis oluşturulmuş ratlarda KOMT-8 ve klodronatın

kombine kullanımının dişeti dokuları kolajenaz ve jelatinaz aktivasyonu üzerine etkilerini değerlendirmiştir. 30 rat salin, endotoksin, endotoksin+ KOMT-8 (1mg/gün oral olarak), endotoksin+ klodronat (subkutan 1mg tek enjeksiyon), endotoksin+KOMT-8+klodronat kombinasyonu gruplarına ayrılmıştır. İlaçlar endotoksin enjeksiyonundan 24 saat sonra verilmiş ve ratlar 7 gün sonra sakrifiye edilerek diş mobiliteleri ölçülmüş ve dişeti dokularında da MMP analizi yapılmıştır. Endotoksin grubunda, salin grubuna göre belirgin alveoler kemik kaybı gözlenmiştir. Tek tek ilaç kullanılan gruplarda kemik kaybında hafif azalma, kombinasyon grubunda ise kontrol grubuna benzer sonuçlar bulunmuştur. LPS uygulaması kolajenaz aktivitesini kontrol grubuna göre artırmış, KOMT-8 ve klodronatın tek başına kullanılması kolajenaz aktivitesini %22-31, kombine tedavi ise %91 azaltmıştır. Llaneras ve arkadaşları<sup>28</sup>nin yaptıkları diğer bir çalışmada, yine E. coli endotoksini ile deneysel periodontitis oluşturulmuş ratlarda KOMT-8 ve klodronatın kombine kullanımının dişeti dokuları kolajenaz (MMP-8) , jelatinaz (MMP-9) ve elastaz aktivitesi üzerine etkileri incelenmiştir. Ratlarda LPS uygulanmasından 1 hafta sonra alveoler kemik kaybı ve kolajenaz (MMP-8) , jelatinaz (MMP-9) ve elastaz aktivitesinde belirgin artış gözlenmiştir (p<0,001). Tek başına KOMT-8 (oral yolla 1mg KOMT-8 içeren 1ml karboksimetilselüloz) veya klodronat (haftada 1/ 1mg subkutan) kullanımının kolajenaz, jelatinaz ve elastaz aktivitesinde azalma sağladığı gözlenmiştir. Tek tek ilaç kullanılan gruplarda kemik kaybında hafif azalma, kombinasyon grubunda ise periodontitis oluşturulmayan kontrol grubuna benzer sonuçlar bulunmuştur. KOMT-8 ve klodronatın kombine tedavisinin dişetinde patolojik olarak yükselmiş MMP, elastaz ve alveoler kemik kaybı seviyelerini 'normalize' ettiği belirlenmiş ve bu etkinin de ilaçların sinerjistik etkisine bağlı olabileceği belirtilmiştir. Çalışmamızda bu çalışmalara paralel olarak jelatinaz ekspresyonunda ve alveoler kemik kaybında azalma gözlenmiş fakat bu çalışmanın sonuçlarından farklı olarak alveoler kemik düzeyi açısından kombine ilaç grubumuzla

periodontitisli tedavi edilmeyen kontrol grubu arasında istatistiksel fark bulunmamıştır. Bu farklılıklar, kullanılan ilaçlar ve dozları, uygulanan tedavi yöntemi ve ratların farklı sistemik durumda olmasından kaynaklanabilir.

Yaffe ve arkadaşlarının çalışmasında <sup>148</sup> ratlarda tetrasiklinler ve alendronat'ın kombine uygulanmasının flap elevasyonu sonrası alveoler kemik yıkımını azaltmadaki etkinliği incelenmiştir. Mukoperiosteal flap kaldırılıp lokal olarak alendronat, %1'lik tetrasiklin hidroklorid, %10'luk doksisisiklin hyclate, alendronat + %10'luk doksisisiklin hyclate, alendronat + %1'lik tetrasiklin hidroklorid uygulanmış gruplardaki kemik yıkım miktarları radyografik olarak karşılaştırılmıştır. Rezorpsiyonun engellenmesinde %10'luk doksisisiklinin en etkili ajan olduğu ve %1'lik tetrasiklinin belirgin bir etkisinin olmadığı fakat alendronatla birlikte kullanıldığında sinerjistik etki sağladığı bildirilmiştir. Aynı zamanda alendronatın doksisisiklinin etkisini fazladan arttırmadığı gözlenmiştir. Bu çalışmada doksisisiklin ve bifosfonat kullanılan gruplarda sinerjistik etki gözlenmemesi doksisisiklinin (%10) yüksek konsantrasyonda hazırlanmış olması ve alendronat ve doksisisiklinin aynı bölgeleri hedef alması sebebiyle olabileceği düşünülmüştür.

Literatür taramalarımızda deneysel periodontitis ve diabet oluşturulan ratlarda doksisisiklin ve klodronat kullanımının IL-1 $\beta$  seviyeleri üzerine etkisini inceleyen bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Çalışmamızda diabetik ratlarda inflamasyon oluşumuyla dişeti bağ dokusu IL-1 $\beta$  ekspresyon skorlarında anlamlı oranda artış gözlenmiştir. Doksisisiklin, bifosfonat ve kombine tedavinin ise inflamasyon sonrası artmış IL-1 $\beta$  seviyelerini azalttığı saptanmıştır. Interlökinlerin MMP ekspresyonunu arttıracak şekilde düzenlediği bilinmektedir. Çalışmamızdaki MMP-9 ve IL-1 $\beta$  düzeyleri arasında görülen korelasyonda bu bulguyu desteklemektedir. Çalışmamızda periodontitis oluşturulduktan sonra doksisisiklin ve

bifosfonatın tek tek ve kombine uygulandığı gruplarda, sadece periodontitis oluşturulmuş gruba göre bağ doku MMP-9 ve IL-1 $\beta$  ekspresyonlarında anlamlı azalma bulunmasına rağmen alveoler kemik kaybı ve mobilitedeki azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmamasının nedeni biyokimyasal değişikliklerin klinik parametrelerden önce görülmesi olabilir. Bununla birlikte çalışmamızda kullanılan ilaçlar periodontitis oluşumunu takiben 1 hafta süreyle uygulanmıştır ve daha uzun dönem ilaç uygulamalarının klinik ve histolojik parametrelerde daha farklı düzelme sağlayabilir. Ratlar üzerinde yaptığımız çalışmamızın sonuçları kronik periodontitisli diyabetik hastalarda uygulanan geleneksel periodontal tedavi yöntemlerine ek olarak doksisisiklin ve bifosfonatların kullanımı için olumlu sonuçlar vermesine rağmen konuyla ilgili uzun dönem deneysel ve klinik çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

## SONUÇ

Deneyisel periodontitis oluşturulmuş diabetik ratlarda düşük doz doksisisiklin ve bifosfonatların tek tek ve kombine uygulamalarının dişeti MMP-2, MMP-9 ve IL-1 $\beta$  düzeyleri ve alveoler kemik seviyesi üzerine etkilerini incelediğimiz çalışmamızda:

1. Tüm ratlarda diabet oluşumundan sonra deney başlangıcına göre kilo kaybı ve bununla birlikte kan glukoz düzeylerinde başlangıç değerlerine göre artış gözlenmiştir.

2. Doksisisiklin, klodronat ve bu ilaçların kombine uygulanmasının deneyisel periodontitis sonrası oluşan alveoler kemik kaybı düzeyini azalttığı ancak sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, gruplar arasındaki farkların anlamlı olmadığı bulgulanmıştır.

3. Klodronat kullanımı ilaç kullanılmayan peridontitis oluşturulan gruba ve kombine ilaç tedavisi kullanılan gruba göre mobilite miktarını istatistiksel olarak anlamlı oranda düşürmüştür.

4. Klodronat ve ilaçların kombine uygulanması deney bölgesinde periodontitis oluşumu sonrası artan inflamasyonu azaltmış, ancak sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, gruplar arasındaki farkların anlamlı olmadığı gözlenmiştir..

5. Klodronat uygulamasının, doksisisiklin uygulamasına göre enflamasyonu istatistiksel düzeyde düşürdüğü görülmüştür.

6. Doksisisiklin, klodronat ve bu ilaçların kombine uygulanması MMP-9 ekspresyonunu ilaç kullanılmayan peridontiits oluşturulan gruba

göre istatistiksel düzeyde azaltmıştır. Ayrıca doksisisiklinin yalnız kullanımının MMP-9 ekspresyonunu azaltmada kombine kullanımdan anlamlı oranda daha etkili olduğu bulunmuştur. Tek başına doksisisiklin kullanımının sadece diabet oluşturulmuş kontrol grubu ratlarındaki MMP-9 ekspresyonunu 'normalize' ettiği bulgulanmıştır.

7. Gruplar arasında MMP-2 ekspresyonu açısından fark bulunmamıştır.

8. Doksisisiklin, klodronat ve bu ilaçların kombine uygulanması, IL-1 $\beta$  ekspresyonunu ilaç kullanılmayan peridontitis grubuna göre anlamlı biçimde azaltmıştır

## ÖZET

### **DIABETİK RATLARDA DÜŞÜK DOZ DOKSİSİKLİN VE BİFOSFONAT KLODRONAT KULLANIMININ ALVEOLER KEMİK KAYBI VE DİŞETİ MATRİKS METALLOPROTEİNAZ -2, -9 VE INTERLÖKİN-1 $\beta$ DÜZEYLERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN HİSTOLOJİK VE İMMÜNOHİSTOKİMYASAL OLARAK İNCELENMESİ**

Diabetin periodontal hastalık riskini arttırdığı bilinmektedir. Doksisisiklin periodontal tedavide antimikrobiyal ve anti-enzimatik etkileriyle kullanılmaktadır. Bifosfonatlarla ilgili yapılan çalışmalarda bu ilaçların alveoler kemik kaybını inhibe ettiği bildirilmiştir. Bu çalışmanın amacı, periodontitis oluşturulmuş diabetik ratlarda düşük doz doksisisiklin ve bifosfonatlardan klodronatın kombine uygulamalarının dişeti MMP-2, -9 ve interlökin-1 $\beta$  düzeyleri üzerine etkilerini incelemek ve bu sonuçları tek başına uygulanan düşük doz doksisisiklin ve bifosfonatlara ait sonuçlar ile karşılaştırmaktır.

50 adet Wistar rat 5 çalışma grubuna ayrılmıştır: Grup1 (diabet kontrol), grup 2 (diabet + periodontitis), grup 3 (diabet + periodontitis + doksisisiklin), grup 4 (diabet + periodontitis + klodronat), grup 5 (diabet + periodontitis + doksisisiklin + klodronat). Ratlarda diabet oluşumu sağlandıktan sonra doksisisiklin ve klodronat tek başına veya kombine halde 7 gün boyunca uygulanmıştır. 7. günde ratlar sakrifiye edilip, dişlerdeki mobilite düzeyleri ölçülmüş, dişeti dokularında histolojik incelemeyle inflamasyon seviyeleri ve immünohistokimyasal analiz ile de MMP-2, MMP-9 ve IL-1 $\beta$  ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Alveoler kemik düzeyi ise ışık mikroskop altında morfometrik olarak ölçülmüştür. Veriler istatistiksel olarak Kruskal Wallis, post hoc Tukey testleri ve Spearman korelasyon analiziyle incelenmiştir.

Alveoler kemik düzeyi ve inflamasyon skorları ölçümlerinde grup 2, 3, 4 ve 5'de grup 1'e göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir ( $p<0,05$ ). İnflamasyon skorları arasındaki fark değerlendirildiğinde grup 2, 3, 4 ve 5'de grup 1'e göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış ( $p<0,05$ ), grup 4'de grup 3'e göre anlamlı bir azalma gözlenmiştir ( $p<0,05$ ). Gruplar arası mobilite skorları değerlendirildiğinde grup 2, 3, 4 ve 5'de grup 1'e göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir ( $p<0,05$ ). Bununla birlikte grup 4'de grup 2'ye ve grup 5'e göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir ( $p<0,05$ ). MMP-9 ekspresyonunda grup 2'de grup 1'e göre anlamlı oranda artış ve grup 3'de grup 1'e göre anlamlı oranda azalma gözlenmiştir. ( $p<0,05$ ) Bununla birlikte, grup 3, 4 ve 5 'de grup 2'ye göre ( $p<0,01$ ) grup 3'de grup 5'e göre ( $p<0,05$ ) istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Gruplar arası MMP-2 ekspresyonunda anlamlı bir fark bulunamamıştır. IL-1 $\beta$  ekspresyonu değerlendirildiğinde grup 2 ile karşılaştırıldığında grup 1, 3, 4 ve 5'de istatistiksel olarak anlamlı oranda azalma gözlenmiştir ( $p<0,01$ ).

Bulgularımızda klodronat ve doksisisiklinin tek tek ve kombine uygulamalarının MMP-9 ve IL-1 $\beta$  ekspresyonunu anlamlı oranda inhibe edebileceği görülmüştür. Bununla beraber çalışmamızda kullanılan ilaçların dişeti dokusu ve alveoler kemik üzerine etkilerini daha iyi değerlendirebilmek için çok gruplu daha fazla sayıda deneğin kullanıldığı yeni çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

## **SUMMARY**

### **EFFECTS OF LOW DOSE DOXYCYCLINE AND BISPHOSPHONATE CLODRONATE ON GINGIVAL LEVELS OF MATRIX METALLOPROTEINASES -2, -9, INTERLEUKIN-1 $\beta$ AND ALVEOLAR BONE LOSS IN DIABETIC RATS. A HISTOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY**

Previous researches indicated that diabetes increases the risk of periodontal diseases. Doxycycline has been widely used in periodontal treatment for its antimicrobial and anti-enzymatic effects. Bisphosphonates have been shown to inhibit alveolar bone resorption. The aim of this research is to evaluate the reduction capacity of low dose doxycycline combined using with a bisphosphonate clodronate on gingival levels of MMP-2, -9, interleukin-1 $\beta$  and alveolar bone loss and compare this treatment model with mono therapies in diabetic rats.

50 adult Wistar rats were divided into five study groups: Group 1 (diabetes control), group 2 (diabetes + periodontitis), group 3 (diabetes + periodontitis + doxycycline), group 4 (diabetes + periodontitis + clodronate), group 5 (diabetes + periodontitis + doxycycline + clodronate). Doxycycline and clodronate were given as a single agent or as combination therapy during the 7 days of the post-experimental periodontitis period. On day 7, the rats were sacrificed and the mobility of the tooth were recorded and block biopsies were removed. The gingival tissues were analyzed histologically and immunohistochemically for expression of MMP-2, MMP-9 and IL-1 $\beta$ . Alveolar bone loss was evaluated morphometrically under a light microscope. Data analysis was performed statistically by Kruskal Wallis and post hoc Tukey tests and Spearman correlation test.

Alveolar bone loss and inflammation scores were significantly higher in the group 2, 3, 4 and 5 than group 1 ( $p < 0,05$ ). Inflammation scores were significantly lower in the group 4 than group 3 ( $p < 0,05$ ). Tooth mobility was significantly increased in the groups 2, 3, 4, 5 compared to group 1 ( $p < 0,05$ ). In addition, mobility score was statistically lower in the group 4 compared to group 2 and 5 ( $p < 0,05$ ). MMP-9 expressions were significantly higher in the group 2 than in the group 1 ( $p < 0,05$ ) and significantly lower in group 3 than 1. At the same time, MMP-9 expressions were higher in group 2 than group 3, 4 and 5 ( $p < 0,01$ ) and significantly higher in group 5 than 3 ( $p < 0,05$ ). No significant differences were found in MMP-2 expressions among the study groups. IL-1 $\beta$  expressions were significantly lower in the group 1, 3, 4, 5 than 2 ( $p < 0,01$ ).

Our findings suggest that combined clodronate and doxycycline and monotherapies may significantly inhibit MMP-9 and IL-1 $\beta$  expressions. However, to better understanding the effects of these drugs on the gingival tissues and alveolar bone, new studies with large amount of groups and test subjects are necessary.

## KAYNAKLAR

1. Struch F, Dau M, Schwahn C, Biffar R, Kocher T, Meisel P. Interleukin-1 gene polymorphism, diabetes, and periodontitis: results from the Study of Health in Pomerania (SHIP). *J Periodontol* 2008;79:501-507.
2. Salvi GE, Lang NP. Host response modulation in the management of periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 2005;32 Suppl 6:108-129.
3. Preshaw PM, Hefti AF, Jepsen S, Etienne D, Walker C, Bradshaw MH. Subantimicrobial dose doxycycline as adjunctive treatment for periodontitis. A review. *J Clin Periodontol* 2004;31:697-707.
4. Newman M TH, Carranza F. Carranza's clinical periodontology; 2006.
5. Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol 2000* 1997;14:216-248.
6. Kornman KS, Page RC, Tonetti MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol 2000* 1997;14:33-53.
7. Darveau RP, Tanner A, Page RC. The microbial challenge in periodontitis. *Periodontol 2000* 1997;14:12-32.
8. Page RC. Milestones in periodontal research and the remaining critical issues. *J Periodontal Res* 1999;34:331-339.

9. Birkedal-Hansen H. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *J Periodontal Res* 1993;28:500-510.
10. Offenbacher S. Periodontal diseases: pathogenesis. *Ann Periodontol* 1996;1:821-878.
11. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2005;28 Suppl 1:S37-42.
12. Mealey BL, Oates TW. Diabetes mellitus and periodontal diseases. *J Periodontol* 2006;77:1289-1303.
13. Loe H. Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1993;16:329-334.
14. Mealey BL, Moritz AJ. Hormonal influences: effects of diabetes mellitus and endogenous female sex steroid hormones on the periodontium. *Periodontol 2000* 2003;32:59-81.
15. Lalla E. Periodontal infections and diabetes mellitus: when will the puzzle be complete? *J Clin Periodontol* 2007;34:913-916.
16. Bagdade JD, Stewart M, Walters E. Impaired granulocyte adherence. A reversible defect in host defense in patients with poorly controlled diabetes. *Diabetes* 1978;27:677-681.
17. Manouchehr-Pour M, Spagnuolo PJ, Rodman HM, Bissada NF. Impaired neutrophil chemotaxis in diabetic patients with severe periodontitis. *J Dent Res* 1981;60:729-730.

18. Mowat A, Baum J. Chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes from patients with diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1971;284:621-627.
19. Kjersem H, Hilsted J, Madsbad S, Wandall JH, Johansen KS, Borregaard N. Polymorphonuclear leucocyte dysfunction during short term metabolic changes from normo- to hyperglycemia in type 1 (insulin dependent) diabetic patients. *Infection* 1988;16:215-221.
20. Marhoffer W, Stein M, Maeser E, Federlin K. Impairment of polymorphonuclear leukocyte function and metabolic control of diabetes. *Diabetes Care* 1992;15:256-260.
21. Taylor GW. Bidirectional interrelationships between diabetes and periodontal diseases: an epidemiologic perspective. *Ann Periodontol* 2001;6:99-112.
22. Lamster IB, Lalla E. Periodontal disease and diabetes mellitus: discussion, conclusions, and recommendations. *Ann Periodontol* 2001;6:146-149.
23. Fleisch H. Bisphosphonates--history and experimental basis. *Bone* 1987;8 Suppl 1:S23-28.
24. Fleisch H, Russell RG, Francis MD. Diphosphonates inhibit hydroxyapatite dissolution in vitro and bone resorption in tissue culture and in vivo. *Science* 1969;165:1262-1264.
25. Golub LM, Ramamurthy NS, McNamara TF, Greenwald RA, Rifkin BR. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown: new therapeutic implications for an old family of drugs. *Crit Rev Oral Biol Med* 1991;2:297-321.

26. Ramamurthy N, Bain S, Liang CT, Barnes J, Llawaneras A, Liu Y et al. A combination of subtherapeutic doses of chemically modified doxycycline (CMT-8) and a bisphosphonate (clodronate) inhibits bone loss in the ovariectomized rat: a dynamic histomorphometric and gene expression study. *Curr Med Chem* 2001;8:295-303.
27. Buduneli E, Vardar-Sengul S, Buduneli N, Atilla G, Wahlgren J, Sorsa T. Matrix metalloproteinases, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1, and laminin-5 gamma2 chain immunolocalization in gingival tissue of endotoxin-induced periodontitis in rats: effects of low-dose doxycycline and alendronate. *J Periodontol* 2007;78:127-134.
28. Llawaneras A, Ramamurthy NS, Heikkila P, Teronen O, Salo T, Rifkin BR et al. A combination of a chemically modified doxycycline and a bisphosphonate synergistically inhibits endotoxin-induced periodontal breakdown in rats. *J Periodontol* 2001;72:1069-1077.
29. Buduneli E, Vardar S, Buduneli N, Berdeli AH, Turkoglu O, Baskesen A et al. Effects of combined systemic administration of low-dose doxycycline and alendronate on endotoxin-induced periodontitis in rats. *J Periodontol* 2004;75:1516-1523.
30. Mealey BL, Ocampo GL. Diabetes mellitus and periodontal disease. *Periodontol* 2000 2007;44:127-153.
31. Virtue MA, Furne JK, Nuttall FQ, Levitt MD. Relationship between GHb concentration and erythrocyte survival determined from breath carbon monoxide concentration. *Diabetes Care* 2004;27:931-935.

32. Furne JK, Springfield JR, Ho SB, Levitt MD. Simplification of the end-alveolar carbon monoxide technique to assess erythrocyte survival. *J Lab Clin Med* 2003;142:52-57.
33. Rohlfing CL, Wiedmeyer HM, Little RR, England JD, Tennill A, Goldstein DE. Defining the relationship between plasma glucose and HbA(1c): analysis of glucose profiles and HbA(1c) in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes Care* 2002;25:275-278.
34. Iacopino AM. Periodontitis and diabetes interrelationships: role of inflammation. *Ann Periodontol* 2001;6:125-137.
35. McMullen JA, Van Dyke TE, Horoszewicz HU, Genco RJ. Neutrophil chemotaxis in individuals with advanced periodontal disease and a genetic predisposition to diabetes mellitus. *J Periodontol* 1981;52:167-173.
36. Salvi GE, Collins JG, Yalda B, Arnold RR, Lang NP, Offenbacher S. Monocytic TNF alpha secretion patterns in IDDM patients with periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 1997;24:8-16.
37. Naguib G, Al-Mashat H, Desta T, Graves DT. Diabetes prolongs the inflammatory response to a bacterial stimulus through cytokine dysregulation. *J Invest Dermatol* 2004;123:87-92.
38. Salvi GE, Yalda B, Collins JG, Jones BH, Smith FW, Arnold RR et al. Inflammatory mediator response as a potential risk marker for periodontal diseases in insulin-dependent diabetes mellitus patients. *J Periodontol* 1997;68:127-135.

39. Khader YS, Dauod AS, El-Qaderi SS, Alkafajei A, Batayha WQ. Periodontal status of diabetics compared with nondiabetics: a meta-analysis. *J Diabetes Complications* 2006;20:59-68.
40. Mattout C, Bourgeois D, Bouchard P. Type 2 diabetes and periodontal indicators: epidemiology in France 2002-2003. *J Periodontol Res* 2006;41:253-258.
41. Javed F, Nasstrom K, Benchimol D, Altamash M, Klinge B, Engstrom PE. Comparison of periodontal and socioeconomic status between subjects with type 2 diabetes mellitus and non-diabetic controls. *J Periodontol* 2007;78:2112-2119.
42. Ringelberg ML, Dixon DO, Francis AO, Plummer RW. Comparison of gingival health and gingival crevicular fluid flow in children with and without diabetes. *J Dent Res* 1977;56:108-111.
43. Orbak R, Simsek S, Orbak Z, Kavrut F, Colak M. The influence of type-1 diabetes mellitus on dentition and oral health in children and adolescents. *Yonsei Med J* 2008;49:357-365.
44. Cutler CW, Machen RL, Jotwani R, Iacopino AM. Heightened gingival inflammation and attachment loss in type 2 diabetics with hyperlipidemia. *J Periodontol* 1999;70:1313-1321.
45. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet* 2005;366:1809-1820.
46. Papapanou PN. Periodontal diseases: epidemiology. *Ann Periodontol* 1996;1:1-36.

47. Mealey B. Diabetes and periodontal diseases. *J Periodontol* 1999;70:935-949.
48. Thorstensson H, Hugoson A. Periodontal disease experience in adult long-duration insulin-dependent diabetics. *J Clin Periodontol* 1993;20:352-358.
49. Kapp JM, Boren SA, Yun S, LeMaster J. Diabetes and tooth loss in a national sample of dentate adults reporting annual dental visits. *Prev Chronic Dis* 2007;4:A59.
50. Katz J, Bhattacharyya I, Farkhondeh-Kish F, Perez FM, Caudle RM, Heft MW. Expression of the receptor of advanced glycation end products in gingival tissues of type 2 diabetes patients with chronic periodontal disease: a study utilizing immunohistochemistry and RT-PCR. *J Clin Periodontol* 2005;32:40-44.
51. Tsai C, Hayes C, Taylor GW. Glycemic control of type 2 diabetes and severe periodontal disease in the US adult population. *Community Dent Oral Epidemiol* 2002;30:182-192.
52. Campus G, Salem A, Uzzau S, Baldoni E, Tonolo G. Diabetes and periodontal disease: a case-control study. *J Periodontol* 2005;76:418-425.
53. Ficara AJ, Levin MP, Grower MF, Kramer GD. A comparison of the glucose and protein content of gingival fluid from diabetics and nondiabetics. *J Periodontal Res* 1975;10:171-175.
54. Nishimura F, Takahashi K, Kurihara M, Takashiba S, Murayama Y. Periodontal disease as a complication of diabetes mellitus. *Ann Periodontol* 1998;3:20-29.

55. Oxford GE, Tayari L, Barfoot MD, Peck AB, Tanaka Y, Humphreys-Beher MG. Salivary EGF levels reduced in diabetic patients. *J Diabetes Complications* 2000;14:140-145.
56. Nagy A, Nagashima H, Cha S, Oxford GE, Zelles T, Peck AB et al. Reduced oral wound healing in the NOD mouse model for type 1 autoimmune diabetes and its reversal by epidermal growth factor supplementation. *Diabetes* 2001;50:2100-2104.
57. Takai N, Shinohara M, Yoshida Y, Ohura K, Mori M, Kakudo Y. Effect of streptozotocin diabetes on gingivitis in plaque-susceptible rats. *J Dent Res* 1986;65:49-52.
58. Zambon JJ, Reynolds H, Fisher JG, Shlossman M, Dunford R, Genco RJ. Microbiological and immunological studies of adult periodontitis in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Periodontol* 1988;59:23-31.
59. Ebersole JL, Holt SC, Hansard R, Novak MJ. Microbiologic and immunologic characteristics of periodontal disease in Hispanic americans with type 2 diabetes. *J Periodontol* 2008;79:637-646.
60. Oliver RC, Tervonen T. Diabetes--a risk factor for periodontitis in adults? *J Periodontol* 1994;65:530-538.
61. Engebretson SP, Vossughi F, Hey-Hadavi J, Emingil G, Grbic JT. The influence of diabetes on gingival crevicular fluid beta-glucuronidase and interleukin-8. *J Clin Periodontol* 2006;33:784-790.
62. Graves DT, Naguib G, Lu H, Leone C, Hsue H, Krall E. Inflammation is more persistent in type 1 diabetic mice. *J Dent Res* 2005;84:324-328.

63. Duarte PM, Neto JB, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH, Jr. Diabetes modulates gene expression in the gingival tissues of patients with chronic periodontitis. *Oral Dis* 2007;13:594-599.
64. Kurtis B, Develioglu H, Taner IL, Balos K, Tekin IO. IL-6 levels in gingival crevicular fluid (GCF) from patients with non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM), adult periodontitis and healthy subjects. *J Oral Sci* 1999;41:163-167.
65. Loder RT. The influence of diabetes mellitus on the healing of closed fractures. *Clin Orthop Relat Res* 1988:210-216.
66. Beam HA, Parsons JR, Lin SS. The effects of blood glucose control upon fracture healing in the BB Wistar rat with diabetes mellitus. *J Orthop Res* 2002;20:1210-1216.
67. Amir G, Rosenmann E, Sherman Y, Greenfeld Z, Ne'eman Z, Cohen AM. Osteoporosis in the Cohen diabetic rat: correlation between histomorphometric changes in bone and microangiopathy. *Lab Invest* 2002;82:1399-1405.
68. Liu R, Bal HS, Desta T, Krothapalli N, Alyassi M, Luan Q et al. Diabetes enhances periodontal bone loss through enhanced resorption and diminished bone formation. *J Dent Res* 2006;85:510-514.
69. He H, Liu R, Desta T, Leone C, Gerstenfeld LC, Graves DT. Diabetes causes decreased osteoclastogenesis, reduced bone formation, and enhanced apoptosis of osteoblastic cells in bacteria stimulated bone loss. *Endocrinology* 2004;145:447-452.

70. Wautier JL, Guillausseau PJ. Diabetes, advanced glycation endproducts and vascular disease. *Vasc Med* 1998;3:131-137.
71. Frantzis TG, Reeve CM, Brown AL, Jr. The ultrastructure of capillary basement membranes in the attached gingiva of diabetic and nondiabetic patients with periodontal disease. *J Periodontol* 1971;42:406-411.
72. Gul N, Ozsoy N. The ultrastructure of the capillaries in the gingiva of alloxan-induced diabetic rats. *Cell Biochem Funct* 2003;21:311-315.
73. Liu R, Desta T, He H, Graves DT. Diabetes alters the response to bacteria by enhancing fibroblast apoptosis. *Endocrinology* 2004;145:2997-3003.
74. Monnier VM, Glomb M, Elgawish A, Sell DR. The mechanism of collagen cross-linking in diabetes: a puzzle nearing resolution. *Diabetes* 1996;45 Suppl 3:S67-72.
75. Schmidt AM, Weidman E, Lalla E, Yan SD, Hori O, Cao R et al. Advanced glycation endproducts (AGEs) induce oxidant stress in the gingiva: a potential mechanism underlying accelerated periodontal disease associated with diabetes. *J Periodontal Res* 1996;31:508-515.
76. Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL, Stern D. Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ Res* 1999;84:489-497.
77. Monnier VM, Bautista O, Kenny D, Sell DR, Fogarty J, Dahms W et al. Skin collagen glycation, glycoxidation, and crosslinking are lower in subjects with long-term intensive versus conventional therapy of type 1

diabetes: relevance of glycated collagen products versus HbA1c as markers of diabetic complications. DCCT Skin Collagen Ancillary Study Group. Diabetes Control and Complications Trial. Diabetes 1999;48:870-880.

78. Odetti P, Traverso N, Cosso L, Noberasco G, Pronzato MA, Marinari UM. Good glycaemic control reduces oxidation and glycation end-products in collagen of diabetic rats. Diabetologia 1996;39:1440-1447.

79. Turk Z, Misur I, Turk N, Benko B. Rat tissue collagen modified by advanced glycation: correlation with duration of diabetes and glycemic control. Clin Chem Lab Med 1999;37:813-820.

80. Gunczler P, Lanes R, Paoli M, Martinis R, Villaroel O, Weisinger JR. Decreased bone mineral density and bone formation markers shortly after diagnosis of clinical type 1 diabetes mellitus. J Pediatr Endocrinol Metab 2001;14:525-528.

81. McCarthy AD, Etcheverry SB, Bruzzone L, Lettieri G, Barrio DA, Cortizo AM. Non-enzymatic glycosylation of a type I collagen matrix: effects on osteoblastic development and oxidative stress. BMC Cell Biol 2001;2:16.

82. 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;52:1502-1510.

83. Schmidt AM, Hori O, Cao R, Yan SD, Brett J, Wautier JL et al. RAGE: a novel cellular receptor for advanced glycation end products. Diabetes 1996;45 Suppl 3:S77-80.

84. Grossi SG. Treatment of periodontal disease and control of diabetes: an assessment of the evidence and need for future research. *Ann Periodontol* 2001;6:138-145.
85. Lalla E, Lamster IB, Feit M, Huang L, Spessot A, Qu W et al. Blockade of RAGE suppresses periodontitis-associated bone loss in diabetic mice. *J Clin Invest* 2000;105:1117-1124.
86. Lalla E, Lamster IB, Stern DM, Schmidt AM. Receptor for advanced glycation end products, inflammation, and accelerated periodontal disease in diabetes: mechanisms and insights into therapeutic modalities. *Ann Periodontol* 2001;6:113-118.
87. Willershausen-Zonnchen B, Lemmen C, Hamm G. Influence of high glucose concentrations on glycosaminoglycan and collagen synthesis in cultured human gingival fibroblasts. *J Clin Periodontol* 1991;18:190-195.
88. Ryan ME, Ramamurthy NS, Sorsa T, Golub LM. MMP-mediated events in diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 1999;878:311-334.
89. Sorsa T, Ingman T, Suomalainen K, Halinen S, Saari H, Kontinen YT et al. Cellular source and tetracycline-inhibition of gingival crevicular fluid collagenase of patients with labile diabetes mellitus. *J Clin Periodontol* 1992;19:146-149.
90. Pontes Andersen CC, Flyvbjerg A, Buschard K, Holmstrup P. Relationship between periodontitis and diabetes: lessons from rodent studies. *J Periodontol* 2007;78:1264-1275.
91. Taylor GW, Burt BA, Becker MP, Genco RJ, Shlossman M, Knowler WC et al. Severe periodontitis and risk for poor glycemic control in patients

with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Periodontol* 1996;67:1085-1093.

92. Faria-Almeida R, Navarro A, Bascones A. Clinical and metabolic changes after conventional treatment of type 2 diabetic patients with chronic periodontitis. *J Periodontol* 2006;77:591-598.

93. Promsudthi A, Pimapansri S, Deerochanawong C, Kanchanasita W. The effect of periodontal therapy on uncontrolled type 2 diabetes mellitus in older subjects. *Oral Dis* 2005;11:293-298.

94. Bendtzen K. Cytokines and natural regulators of cytokines. *Immunol Lett* 1994;43:111-123.

95. O G. Ağız hastalıkları ve çene cerrahisinde immünoloji: Ankara Unv Diş Hek Fak Yayınları; 1995.

96. Ebersole JL, Cappelli D. Acute-phase reactants in infections and inflammatory diseases. *Periodontol* 2000;23:19-49.

97. Colotta F, Sironi M, Borre A, Pollicino T, Bernasconi S, Boraschi D et al. Type II interleukin-1 receptor is not expressed in cultured endothelial cells and is not involved in endothelial cell activation. *Blood* 1993;81:1347-1351.

98. Tatakis DN. Interleukin-1 and bone metabolism: a review. *J Periodontol* 1993;64:416-431.

99. Seymour GJ, Gemmell E. Cytokines in periodontal disease: where to from here? *Acta Odontol Scand* 2001;59:167-173.

100. Preiss DS, Meyle J. Interleukin-1 beta concentration of gingival crevicular fluid. *J Periodontol* 1994;65:423-428.
101. Mizel SB. Interleukin 1 and T cell activation. *Immunol Rev* 1982;63:51-72.
102. Chiplunkar S, Langhorne J, Kaufmann SH. Stimulation of B cell growth and differentiation by murine recombinant interleukin 1. *J Immunol* 1986;137:3748-3752.
103. Dewhirst FE, Stashenko PP, Mole JE, Tsurumachi T. Purification and partial sequence of human osteoclast-activating factor: identity with interleukin 1 beta. *J Immunol* 1985;135:2562-2568.
104. Ohshima M, Otsuka K, Suzuki K. Interleukin-1 beta stimulates collagenase production by cultured human periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontal Res* 1994;29:421-429.
105. Sauder DN, Mounessa NL, Katz SI, Dinarello CA, Gallin JI. Chemotactic cytokines: the role of leukocytic pyrogen and epidermal cell thymocyte-activating factor in neutrophil chemotaxis. *J Immunol* 1984;132:828-832.
106. Westmacott D, Wadsworth J, Bloxham DP. Chemotactic activity of recombinant human interleukin-1. *Agents Actions* 1987;21:323-324.
107. Ishihara Y, Nishihara T, Kuroyanagi T, Shirozu N, Yamagishi E, Ohguchi M et al. Gingival crevicular interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist levels in periodontally healthy and diseased sites. *J Periodontal Res* 1997;32:524-529.

108. Goutoudi P, Diza E, Arvanitidou M. Effect of periodontal therapy on crevicular fluid interleukin-1beta and interleukin-10 levels in chronic periodontitis. *J Dent* 2004;32:511-520.
109. Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol* 1993;64:474-484.
110. Reynolds JJ, Meikle MC. Mechanisms of connective tissue matrix destruction in periodontitis. *Periodontol 2000* 1997;14:144-157.
111. Ryan ME, Ramamurthy S, Golub LM. Matrix metalloproteinases and their inhibition in periodontal treatment. *Curr Opin Periodontol* 1996;3:85-96.
112. Golub LM, Ryan ME, Williams RC. Modulation of the host response in the treatment of periodontitis. *Dent Today* 1998;17:102-106, 108-109.
113. Golub LM, Sorsa T, Lee HM, Ciancio S, Sorbi D, Ramamurthy NS et al. Doxycycline inhibits neutrophil (PMN)-type matrix metalloproteinases in human adult periodontitis gingiva. *J Clin Periodontol* 1995;22:100-109.
114. Mariotti A. The extracellular matrix of the periodontium: dynamic and interactive tissues. *Periodontol 2000* 1993;3:39-63.
115. Kinane DF, Darby IB, Said S, Luoto H, Sorsa T, Tikanoja S et al. Changes in gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8 levels during periodontal treatment and maintenance. *J Periodontal Res* 2003;38:400-404.

116. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003;92:827-839.
117. Sorsa T, Tjaderhane L, Salo T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Dis* 2004;10:311-318.
118. Reel B. Matriks metalloproteinaz enzimleri ve ateoskleroz. *Türkiye klinikleri J Med Sci* 2006:527-537.
119. Kadoglou NP, Daskalopoulou SS, Perrea D, Liapis CD. Matrix metalloproteinases and diabetic vascular complications. *Angiology* 2005;56:173-189.
120. Diabetes and periodontal diseases. Committee on Research, Science and Therapy. American Academy of Periodontology. *J Periodontol* 2000;71:664-678.
121. Korostoff JM, Wang JF, Sarment DP, Stewart JC, Feldman RS, Billings PC. Analysis of in situ protease activity in chronic adult periodontitis patients: expression of activated MMP-2 and a 40 kDa serine protease. *J Periodontol* 2000;71:353-360.
122. Achong R, Nishimura I, Ramachandran H, Howell TH, Fiorellini JP, Karimbux NY. Membrane type (MT) 1-matrix metalloproteinase (MMP) and MMP-2 expression in ligature-induced periodontitis in the rat. *J Periodontol* 2003;74:494-500.
123. Smith PC, Munoz VC, Collados L, Oyarzun AD. In situ detection of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in gingival epithelium in human periodontal disease. *J Periodontal Res* 2004;39:87-92.

124. de Souza AP, Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, de Brito RB, Jr., Barros SP, Line SR. Analysis of the MMP-9 (C-1562 T) and TIMP-2 (G-418C) gene promoter polymorphisms in patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2005;32:207-211.
125. Accorsi-Mendonca T, Zambuzzi WF, da Silva Paiva KB, Pereira Lauris JR, Cestari TM, Taga R et al. Expression of metalloproteinase 2 in the cell response to porous demineralized bovine bone matrix. *J Mol Histol* 2005;36:311-316.
126. Reponen P, Sahlberg C, Munaut C, Thesleff I, Tryggvason K. High expression of 92-kD type IV collagenase (gelatinase B) in the osteoclast lineage during mouse development. *J Cell Biol* 1994;124:1091-1102.
127. Nguyen M, Arkell J, Jackson CJ. Human endothelial gelatinases and angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 2001;33:960-970.
128. Rodini CO, Batista AC, Dionisio TJ, Santos CF, Cunha FQ, Lara VS. Morphologic evaluation and expression of matrix metalloproteinases-2 and 9 and nitric oxide during experimental periodontal disease in rat. *J Mol Histol* 2008;39:275-282.
129. kayaalp o. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji; 1998.
130. Ciancio SG, Mather ML, McMullen JA. An evaluation of minocycline in patients with periodontal disease. *J Periodontol* 1980;51:530-534.
131. Lindhe J, Liljenberg B, Adielsson B. Effect of long-term tetracycline therapy on human periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1983;10:590-601.

132. Slots J, Rosling BG. Suppression of the periodontopathic microflora in localized juvenile periodontitis by systemic tetracycline. *J Clin Periodontol* 1983;10:465-486.
133. Alger FA, Solt CW, Vuddhakanok S, Miles K. The histologic evaluation of new attachment in periodontally diseased human roots treated with tetracycline-hydrochloride and fibronectin. *J Periodontol* 1990;61:447-455.
134. Ingman T, Sorsa T, Suomalainen K, Halinen S, Lindy O, Lauhio A et al. Tetracycline inhibition and the cellular source of collagenase in gingival crevicular fluid in different periodontal diseases. A review article. *J Periodontol* 1993;64:82-88.
135. Ramamurthy NS, Golub LM. Diabetes increases collagenase activity in extracts of rat gingiva and skin. *J Periodontal Res* 1983;18:23-30.
136. Golub LM, Lee HM, Lehrer G, Nemiroff A, McNamara TF, Kaplan R et al. Minocycline reduces gingival collagenolytic activity during diabetes. Preliminary observations and a proposed new mechanism of action. *J Periodontal Res* 1983;18:516-526.
137. Golub LM, Ramamurthy N, McNamara TF, Gomes B, Wolff M, Casino A et al. Tetracyclines inhibit tissue collagenase activity. A new mechanism in the treatment of periodontal disease. *J Periodontal Res* 1984;19:651-655.
138. Ryan ME, Usman A, Ramamurthy NS, Golub LM, Greenwald RA. Excessive matrix metalloproteinase activity in diabetes: inhibition by tetracycline analogues with zinc reactivity. *Curr Med Chem* 2001;8:305-316.

139. Ericsson I, Lindhe J, Liljenberg B, Persson AL. Lack of bacterial invasion in experimental periodontitis. *J Clin Periodontol* 1987;14:478-485.
140. Jeffcoat MK, Williams RC, Kaplan ML, Goldhaber P. Tetracycline treatment of periodontal disease in the beagle dog. *J Periodontal Res* 1982;17:545-551.
141. Golub LM, Lee HM, Ryan ME, Giannobile WV, Payne J, Sorsa T. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-antimicrobial mechanisms. *Adv Dent Res* 1998;12:12-26.
142. Wasil M, Halliwell B, Moorhouse CP. Scavenging of hypochlorous acid by tetracycline, rifampicin and some other antibiotics: a possible antioxidant action of rifampicin and tetracycline? *Biochem Pharmacol* 1988;37:775-778.
143. Nagase H, Itoh Y, Binner S. Interaction of alpha 2-macroglobulin with matrix metalloproteinases and its use for identification of their active forms. *Ann N Y Acad Sci* 1994;732:294-302.
144. Crout RJ, Lee HM, Schroeder K, Crout H, Ramamurthy NS, Wiener M et al. The "cyclic" regimen of low-dose doxycycline for adult periodontitis: a preliminary study. *J Periodontol* 1996;67:506-514.
145. Michaelis J, Vissers MC, Winterbourn CC. Human neutrophil collagenase cleaves alpha 1-antitrypsin. *Biochem J* 1990;270:809-814.
146. Rifkin BR, Vernillo AT, Golub LM, Ramamurthy NS. Modulation of bone resorption by tetracyclines. *Ann N Y Acad Sci* 1994;732:165-180.
147. Milano S, Arcoleo F, D'Agostino P, Cillari E. Intraperitoneal injection of tetracyclines protects mice from lethal endotoxemia downregulating

inducible nitric oxide synthase in various organs and cytokine and nitrate secretion in blood. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:117-121.

148. Shapira L, Soskolne WA, Houri Y, Barak V, Halabi A, Stabholz A. Protection against endotoxic shock and lipopolysaccharide-induced local inflammation by tetracycline: correlation with inhibition of cytokine secretion. *Infect Immun* 1996;64:825-828.

149. Amin AR, Patel RN, Thakker GD, Lowenstein CJ, Attur MG, Abramson SB. Post-transcriptional regulation of inducible nitric oxide synthase mRNA in murine macrophages by doxycycline and chemically modified tetracyclines. *FEBS Lett* 1997;410:259-264.

150. Pruzanski W, Greenwald RA, Street IP, Laliberte F, Stefanski E, Vadas P. Inhibition of enzymatic activity of phospholipases A2 by minocycline and doxycycline. *Biochem Pharmacol* 1992;44:1165-1170.

151. Webster GF, Toso SM, Hegemann L. Inhibition of a model of in vitro granuloma formation by tetracyclines and ciprofloxacin. Involvement of protein kinase C. *Arch Dermatol* 1994;130:748-752.

152. Golub LM, McNamara TF, D'Angelo G, Greenwald RA, Ramamurthy NS. A non-antibacterial chemically-modified tetracycline inhibits mammalian collagenase activity. *J Dent Res* 1987;66:1310-1314.

153. Greenwald RA, Golub LM, Ramamurthy NS, Chowdhury M, Moak SA, Sorsa T. In vitro sensitivity of the three mammalian collagenases to tetracycline inhibition: relationship to bone and cartilage degradation. *Bone* 1998;22:33-38.

154. Bettany JT, Wolowacz RG. Tetracycline derivatives induce apoptosis selectively in cultured monocytes and macrophages but not in mesenchymal cells. *Adv Dent Res* 1998;12:136-143.
155. Makela M, Sorsa T, Uitto VJ, Salo T, Teronen O, Larjava H. The effects of chemically modified tetracyclines (CMTs) on human keratinocyte proliferation and migration. *Adv Dent Res* 1998;12:131-135.
156. Ryan ME, Ramamurthy NS, Golub LM. Tetracyclines inhibit protein glycation in experimental diabetes. *Adv Dent Res* 1998;12:152-158.
157. Burns FR, Stack MS, Gray RD, Paterson CA. Inhibition of purified collagenase from alkali-burned rabbit corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989;30:1569-1575.
158. Golub LM, Ciancio S, Ramamurthy NS, Leung M, McNamara TF. Low-dose doxycycline therapy: effect on gingival and crevicular fluid collagenase activity in humans. *J Periodontal Res* 1990;25:321-330.
159. Golub LM, Wolff M, Roberts S, Lee HM, Leung M, Payonk GS. Treating periodontal diseases by blocking tissue-destructive enzymes. *J Am Dent Assoc* 1994;125:163-169; discussion 169-171.
160. Bezerra MM, Brito GA, Ribeiro RA, Rocha FA. Low-dose doxycycline prevents inflammatory bone resorption in rats. *Braz J Med Biol Res* 2002;35:613-616.
161. Golub LM, McNamara TF, Ryan ME, Kohut B, Blieden T, Payonk G et al. Adjunctive treatment with subantimicrobial doses of doxycycline: effects on gingival fluid collagenase activity and attachment loss in adult periodontitis. *J Clin Periodontol* 2001;28:146-156.

162. Novak MJ, Johns LP, Miller RC, Bradshaw MH. Adjunctive benefits of subantimicrobial dose doxycycline in the management of severe, generalized, chronic periodontitis. *J Periodontol* 2002;73:762-769.

163. Preshaw PM, Hefti AF, Novak MJ, Michalowicz BS, Pihlstrom BL, Schoor R et al. Subantimicrobial dose doxycycline enhances the efficacy of scaling and root planing in chronic periodontitis: a multicenter trial. *J Periodontol* 2004;75:1068-1076.

164. Emingil G, Atilla G, Sorsa T, Luoto H, Kirilmaz L, Baylas H. The effect of adjunctive low-dose doxycycline therapy on clinical parameters and gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8 levels in chronic periodontitis. *J Periodontol* 2004;75:106-115.

165. Emingil G, Atilla G, Sorsa T, Savolainen P, Baylas H. Effectiveness of adjunctive low-dose doxycycline therapy on clinical parameters and gingival crevicular fluid laminin-5 gamma2 chain levels in chronic periodontitis. *J Periodontol* 2004;75:1387-1396.

166. Caton JG, Ciancio SG, Blieden TM, Bradshaw M, Crout RJ, Hefti AF et al. Treatment with subantimicrobial dose doxycycline improves the efficacy of scaling and root planing in patients with adult periodontitis. *J Periodontol* 2000;71:521-532.

167. Walker C, Puumala S, Golub LM, Stoner JA, Reinhardt RA, Lee HM et al. Subantimicrobial dose doxycycline effects on osteopenic bone loss: microbiologic results. *J Periodontol* 2007;78:1590-1601.

168. Thomas J, Walker C, Bradshaw M. Long-term use of subantimicrobial dose doxycycline does not lead to changes in antimicrobial susceptibility. *J Periodontol* 2000;71:1472-1483.

169. Chavassieux PM, Arlot ME, Reda C, Wei L, Yates AJ, Meunier PJ. Histomorphometric assessment of the long-term effects of alendronate on bone quality and remodeling in patients with osteoporosis. *J Clin Invest* 1997;100:1475-1480.
170. Rodan GA. Mechanisms of action of bisphosphonates. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998;38:375-388.
171. Rogers MJ, Gordon S, Benford HL, Coxon FP, Luckman SP, Monkkonen J et al. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer* 2000;88:2961-2978.
172. Fleisch H. Bisphosphonates: mechanisms of action. *Endocr Rev* 1998;19:80-100.
173. Shinozaki T, Pritzker KP. Regulation of alkaline phosphatase: implications for calcium pyrophosphate dihydrate crystal dissolution and other alkaline phosphatase functions. *J Rheumatol* 1996;23:677-683.
174. Tenenbaum HC, Shelemay A, Girard B, Zohar R, Fritz PC. Bisphosphonates and periodontics: potential applications for regulation of bone mass in the periodontium and other therapeutic/diagnostic uses. *J Periodontol* 2002;73:813-822.
175. Hughes DE, Wright KR, Uy HL, Sasaki A, Yoneda T, Roodman GD et al. Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res* 1995;10:1478-1487.
176. Rogers MJ. From molds and macrophages to mevalonate: a decade of progress in understanding the molecular mode of action of bisphosphonates. *Calcif Tissue Int* 2004;75:451-461.

177. Kostenuik PJ. Osteoprotegerin and RANKL regulate bone resorption, density, geometry and strength. *Curr Opin Pharmacol* 2005;5:618-625.
178. Bilezikian JP. Osteonecrosis of the jaw--do bisphosphonates pose a risk? *N Engl J Med* 2006;355:2278-2281.
179. Migliorati CA. Bisphosphonates and oral cavity avascular bone necrosis. *J Clin Oncol* 2003;21:4253-4254.
180. Migliorati CA, Siegel MA, Elting LS. Bisphosphonate-associated osteonecrosis: a long-term complication of bisphosphonate treatment. *Lancet Oncol* 2006;7:508-514.
181. Ott SM. Long-term safety of bisphosphonates. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:1897-1899.
182. Odvina CV, Zerwekh JE, Rao DS, Maalouf N, Gottschalk FA, Pak CY. Severely suppressed bone turnover: a potential complication of alendronate therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:1294-1301.
183. Weinreb M, Quartuccio H, Seedor JG, Aufdemorte TB, Brunsvold M, Chaves E et al. Histomorphometrical analysis of the effects of the bisphosphonate alendronate on bone loss caused by experimental periodontitis in monkeys. *J Periodontal Res* 1994;29:35-40.
184. Teronen O, Heikkila P, Konttinen YT, Laitinen M, Salo T, Hanemaaijer R et al. MMP inhibition and downregulation by bisphosphonates. *Ann N Y Acad Sci* 1999;878:453-465.
185. Binderman I, Adut M, Yaffe A. Effectiveness of local delivery of alendronate in reducing alveolar bone loss following periodontal surgery in rats. *J Periodontol* 2000;71:1236-1240.

186. Yu Z, Ramamurthy NS, Leung M, Chang KM, McNamara TF, Golub LM. Chemically-modified tetracycline normalizes collagen metabolism in diabetic rats: a dose-response study. *J Periodontal Res* 1993;28:420-428.
187. Ramamurthy NS, Kucine AJ, McClain SA, McNamara TF, Golub LM. Topically applied CMT-2 enhances wound healing in streptozotocin diabetic rat skin. *Adv Dent Res* 1998;12:144-148.
188. Choi DH, Moon IS, Choi BK, Paik JW, Kim YS, Choi SH et al. Effects of sub-antimicrobial dose doxycycline therapy on crevicular fluid MMP-8, and gingival tissue MMP-9, TIMP-1 and IL-6 levels in chronic periodontitis. *J Periodontal Res* 2004;39:20-26.
189. Yaffe A, Herman A, Bahar H, Binderman I. Combined local application of tetracycline and bisphosphonate reduces alveolar bone resorption in rats. *J Periodontol* 2003;74:1038-1042.
190. Holzhausen M, Garcia DF, Pepato MT, Marcantonio E, Jr. The influence of short-term diabetes mellitus and insulin therapy on alveolar bone loss in rats. *J Periodontal Res* 2004;39:188-193.
191. Doxey DL, Cutler CW, Iacopino AM. Diabetes prevents periodontitis-induced increases in gingival platelet derived growth factor-B and interleukin 1-beta in a rat model. *J Periodontol* 1998;69:113-119.
192. Bezerra MM, de Lima V, Alencar VB, Vieira IB, Brito GA, Ribeiro RA et al. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol* 2000;71:1009-1014.

193. Ramamurthy NS, Rifkin BR, Greenwald RA, Xu JW, Liu Y, Turner G et al. Inhibition of matrix metalloproteinase-mediated periodontal bone loss in rats: a comparison of 6 chemically modified tetracyclines. *J Periodontol* 2002;73:726-734.
194. Alencar VB, Bezerra MM, Lima V, Abreu AL, Brito GA, Rocha FA et al. Disodium clodronate prevents bone resorption in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol* 2002;73:251-256.
195. Llavaneras A, Golub LM, Rifkin BR, Heikkila P, Sorsa T, Teronen O et al. CMT-8/clodronate combination therapy synergistically inhibits alveolar bone loss in LPS-induced periodontitis. *Ann N Y Acad Sci* 1999;878:671-674.
196. Hirshberg LM. Place of electroencephalographic biofeedback for attention-deficit/hyperactivity disorder. *Expert Rev Neurother* 2007;7:315-319.
197. King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 1998;21:1414-1431.
198. Novak MJ, Potter RM, Blodgett J, Ebersole JL. Periodontal disease in Hispanic Americans with type 2 diabetes. *J Periodontol* 2008;79:629-636.
199. O'Connell PA, Taba M, Nomizo A, Foss Freitas MC, Suaid FA, Uyemura SA et al. Effects of periodontal therapy on glycemic control and inflammatory markers. *J Periodontol* 2008;79:774-783.

200. Klausen B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. *J Periodontol* 1991;62:59-73.
201. Listgarten MA. Similarity of epithelial relationships in the gingiva of rat and man. *J Periodontol* 1975;46:677-680.
202. Vardı N UM, Iraz M, Öztürk F. Deneysel diyabetin sıçan endokrin pankreasında oluşturduğu morfolojik değişiklikler. *Türkiye klinikleri J Med Sci* 2003;23:27-32.
203. Sakallıoğlu E KG, Sakallıoğlu U, Keskiner İ, Lütfioğlu M, Açıkgöz G. Diabetin periodontal inflamasyon ve doku yıkımına etkisi. *Hacettepe Dişhekimliği Fakültesi Dergisi* 2007;31:74-81.
204. Andersson AK, Sandler S. Melatonin protects against streptozotocin, but not interleukin-1beta-induced damage of rodent pancreatic beta-cells. *J Pineal Res* 2001;30:157-165.
205. Makela M, Salo T, Uitto VJ, Larjava H. Matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) of the oral cavity: cellular origin and relationship to periodontal status. *J Dent Res* 1994;73:1397-1406.
206. Silva JA, Lorencini M, Peroni LA, De La Hoz CL, Carvalho HF, Stach-Machado DR. The influence of type I diabetes mellitus on the expression and activity of gelatinases (matrix metalloproteinases-2 and -9) in induced periodontal disease. *J Periodontal Res* 2008;43:48-54.
207. Duarte PM, de Oliveira MC, Tambeli CH, Parada CA, Casati MZ, Nociti FH, Jr. Overexpression of interleukin-1beta and interleukin-6 may

play an important role in periodontal breakdown in type 2 diabetic patients. J Periodontal Res 2007;42:377-381.

208. Pontes Andersen CC, Buschard K, Flyvbjerg A, Stoltze K, Holmstrup P. Periodontitis deteriorates metabolic control in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. J Periodontol 2006;77:350-356.

209. Rocha M, Nava LE, Vazquez de la Torre C, Sanchez-Marin F, Garay-Sevilla ME, Malacara JM. Clinical and radiological improvement of periodontal disease in patients with type 2 diabetes mellitus treated with alendronate: a randomized, placebo-controlled trial. J Periodontol 2001;72:204-209.

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı:** Selin

**Soyadı:** Pınar Özdemir

**Doğum yeri ve tarihi:** Ankara, 1979

**Eğitimi:**

Doktora Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı (Ankara, 2003-2009)

Üniversite öğrenimi Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi (Ankara, 1997-2002)

Orta ve lise öğrenimi TED Kdz Ereğli Koleji (Kdz Ereğli / Zonguldak, 1990-1997 )

İlköğrenimi TED Kdz Ereğli Koleji (Kdz Ereğli / Zonguldak, 1985-1990)

**Yabancı dili:** İngilizce

## TEŞEKKÜR

Periodontoloji alanında doktora eğitimi almama olanak sağlayan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Köksal Baloş' a,

Doktora eğitimime çok değerli bilgileriyle katkıda bulunan Sayın Prof.Dr. Gönen Özcan'a,

Doktora eğitimim süresince benden, desteğini, bilgisini esirgemeyen tecrübeleriyle yol gösteren değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Bülent Kurtiş'e,

Değerli çalışmalarında beraber çalışma imkanı sağlayan ve bana doktora eğitim süresince katkıda bulunan Sayın Prof. Dr. Gülay Tüter' e,

Tez çalışmama çok değerli bilgileriyle katkıda bulunan Sayın Doç. Dr. Sibel Elif Gültekin'e,

Tez çalışmama büyük katkıları bulunan Prof. Dr. Nurşen Başaran, Dr. Burcu Sengüven, Uzm. Ecz. Sevtap Aydın'a

G. Ü. Periodontoloji Anabilim Dalındaki eğitimim boyunca emeği geçen tüm öğretim üyelerine,

Çalışma süresince, klinik uygulamalarda bana yardımcı olan, desteğini ve dostluğunu hiçbir zaman esirgemeyen sevgili çalışma arkadaşlarım, Dr. İlkim Demirel, Arş. Gör. Dt. Utku Toyman, Arş. Gör. Duygu Boynueğri, Arş. Gör. Beste Uyanık, Dr. Dilek Uç'a

Varlığıyla bana güç veren ve tüm zorluklarda yanımda olan sevgili eşim Ersin Özdemir'e

Hayatım boyunca bana destek olan, yüreklendiren, inanan annem Gülşen Pınar, babam Dr. Güven Pınar kardeşim Dr. Pelin Pınar Deniz'e

En içten teşekkürlerimi sunarım.

T.C  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
REKTÖRLÜĞÜ  
Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı

29/..7/2005

SAYI : B.30.2.GÜN.0.EU.00.00/ 80 - 10634  
KONU:

Sayın

**Doç.Dr.Bülent KURTİŞ**  
Gazi Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi  
Periodontoloji Anabilim Dalı  
Öğretim Üyesi

G.Ü.ET-05.049 kod numaralı ve "*Diabetik Ratlarda Düşük Doz Doksisisiklin ve Bifosfonat Klodronat'ın Kombine Kullanımının Periodontal İyileşme ve Dişeti Matriks Metalloproteinaz 2-9 ve Interlökin-1 $\beta$  Düzeyleri Üzerine Etkisinin Histolojik ve İmmünohistokimyasal Olarak İncelenmesi*" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanmıştır.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

I certify that the research project numbered G.Ü.ET-05.049 and entitled "*Effects of low dose doxycycline combined using with a bisphosphonate on the periodontal healing and gingival levels of matrix metalloproteinases 2-9 and interleukin-1 $\beta$  in diabetic rats. A Histological and immunohistochemical study.*" is in compliance with Gazi University Ethical Council regulations.

With my best regards.

**Prof.Dr.Gökhan ALPASLAN**  
Gazi Üniversitesi  
Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanı

