



**DENEYSEL PERİODONTİTİSLİ RATLARDA SİSTEMİK
MELATONİN UYGULAMASININ PERİODONTİTİS İLİŞKİLİ
BÖBREK HASARI ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Dt. Büşra ÜNVER

Periodontoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Oğuz KÖSE

Uzmanlık Tezi-2021

T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

**DENEYSEL PERİODONTİTİSLİ RATLARDA SİSTEMİK
MELATONİN UYGULAMASININ PERİODONTİTİS İLİŞKİLİ
BÖBREK HASARI ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Dt. Büşra ÜNVER

Periodontoloji Programı

Uzmanlık Tezi

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Oğuz KÖSE

RİZE - 2021

T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
PERİODONTOLOĞİ UZMANLIK EĞİTİM PROGRAMI

**DENEYSEL PERİODONTİTİSLİ RATLARDA SİSTEMİK MELATONİN
UYGULAMASININ PERİODONTİTİS İLİŞKİLİ BÖBREK HASARI
ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Dt. Büşra ÜNVER

Tez Savunma Tarihi : 11.01.2021

Tez Danışmanı : Doç. Dr. OĞuz KÖSE
(Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi)



Jüri Üyesi : Prof. Dr. Varol ÇANAKÇI
(Ordu Üniversitesi)



Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Meltem ZİHNİ KORKMAZ
(Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi)



Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Hatice YEMENOĞLU
(Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi)

Onay

Bu çalışma yukardaki jüri tarafından Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Zeynep YEŞİL DUYMUŐ

Fakülte Dekanı

Uzmanlık Tezi

RİZE - 2021

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	VI
ÖZET	VII
ABSTRACT.....	IX
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	XI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XVI
TABLolar DİZİNİ.....	XVIII
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Periodontal Hastalıklar	3
2.1.1. Periodontal Hastalıkların Sınıflandırılması	3
2.1.2. Periodontal Sağlık.....	4
2.1.3. Mikrobiyal Dental Plak ile İlişkili Gingivitis	5
2.1.4. Mikrobiyal Dental Plak İle İlişkili Olmayan Gingivitis	6
2.1.5. Periodontitis	6
2.1.5.1. Periodontitis Patogenezi	13
2.1.5.1.1. Periodontal İnflamasyon	15
2.1.5.1.2. Kemik Kaybında Rol Oynayan Sitokinler	18
2.1.5.1.3. Reaktif Oksijen Türlerinin Periodontitis Patogenezindeki Rolü	19
2.2. Oksidan ve Antioksidan Sistem.....	20
2.2.1. Total Antioksidan Kapasite, Total Oksidatif Durum ve Oksidatif Stres İndeksi ...	21

2.2.2. Malondialdehit	22
2.2.3. Glutasyon	22
2.3. Böbrek.....	23
2.3.1. Böbreğin Anatomisi.....	23
2.3.2. Böbreğin Fizyolojisi	24
2.3.3. Böbrek Fonksiyonları	25
2.3.4. Böbrek Fonksiyon Parametreleri ve Önemi.....	28
2.3.4.1. Kreatinin, Üre ve Sistatin C.....	28
2.3.4.2. Apoptozis ve Kaspazlar	31
2.3.4.3. Katepsinler	32
2.4. Periodontitis ve Böbrek	33
2.5. Melatonin	36
2.5.1. Melatonin Hormonu ve Özellikleri.....	36
2.5.2. Melatonin Hormonunun Etkileri.....	38
2.6. Melatonin ve Periodontitis	42
2.7. Melatonin ve Böbrek	43
2.8. Periodontitis, Böbrek ve Melatonin	45
3. MATERYAL VE METOD	46
3.1. Deney Hayvanlarının Temin Edilmesi ve Barınması	46
3.1.1. Çalışma Grupları.....	47
3.2. Ligatür ile Periodontitis İndüksiyonu	48
3.3. Melatonin Uygulanması.....	49

3.4. Örneklerin Toplanması ve Hazırlanması	50
3.5. Alveolar Kemik Kayıplarının Belirlenmesi	52
3.5.1. Histomorfometrik Analizler	52
3.5.2. Radyomorfometrik Analizler	52
3.6. Biyokimyasal Analizler	53
3.6.1. Çalışmada Kullanılan Araç ve Gereçler	53
3.6.2. Kullanılan Kimyasal Materyaller ve Marka Adları	53
3.6.3. Doku Homojenatlarının Hazırlanması	54
3.6.4. Doku Malondialdehit Düzeylerinin Belirlenmesi	55
3.6.4.1. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı	55
3.6.4.2. Deneyin Yapılışı	55
3.6.5. Doku Glutasyon Düzeylerinin Belirlenmesi	56
3.6.5.1. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı	56
3.6.5.2. Deneyin Yapılışı	56
3.6.6. Doku Total Oksidan Düzeylerinin Belirlenmesi	56
3.6.6.1. Kitin Çalışma Prosedürü	57
3.6.7. Doku Total Antioksidan Düzeylerinin Belirlenmesi	57
3.6.7.1. Kitin Çalışma Prosedürü	58
3.6.8. Oksidatif Stres İndexinin Hesaplanması	58
3.6.9. Doku İnflamatuar Sitokin ve Enzim Düzeylerinin Belirlenmesi	58
3.6.9.1. TNF- α , IL-1 β , KtD ve MMP-8 Düzeylerinin ELISA Kitiyle Analiz Edilmesi..	58
3.6.9.1.1. Kitin Çalışma Prosedürü	59

3.6.9.2. MMP-9 Düzeylerinin ELISA Kitiyle Analiz Edilmesi.....	59
3.6.9.2.1. Reaktiflerin Hazırlanması	60
3.6.9.2.2. Kitin Çalışma Prosedürü	60
3.7. Böbrek Fonksiyonel Kapasitesinin Belirlenmesi.....	63
3.8. Histopatolojik Analizler.....	63
3.8.1. Histolojik Doku Takibi Prosedürleri.....	63
3.8.2. Hematoksilen–Eozin ile Boyama Prosedürü	67
3.8.3. Histopatolojik Analiz.....	69
3.8.4. Böbreğin İmmunohistokimyasal Analizi.....	69
3.8.5. İmmunohistokimyasal Boyama Prosedürü	70
3.8.6. Kantitatif Analiz	72
3.9. İstatistiksel Analiz.....	72
4. BULGULAR	73
4.1. Morfometrik Bulgular (Alveoler Kemik Kayıpları)	73
4.2. Biyokimyasal Bulgular	75
4.2.1. Doku Malondialdehit Düzeyleri	75
4.2.2. Doku Glutasyon Düzeyleri.....	75
4.2.3. Doku TAOK, TOD ve OSİ Düzeyleri	75
4.2.4. Doku Proinflamatuvar Sitokin ve Enzim Seviyeleri.....	76
4.3. Böbrek Fonksiyon Parametreleri	77
4.4. Histopatolojik Bulgular.....	78
4.4.1. Işık Mikroskobu Bulguları.....	78

4.4.2. İmmunohistokimyasal Bulgular.....	79
4.4.3. Semi-kantitatif Analiz Bulguları.....	80
5. TARTIŞMA.....	82
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	94
KAYNAKLAR	95
EKLER	112
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	112
EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU	113

TEŞEKKÜR

Başta, gerek uzmanlık eğitimimde gerekse mesleki hedeflerimde belirleyici olan, geniŐ bilgi birikimi ile klinik tecrübelerini esirgemeyen tez danıŐman hocam Doç. Dr. Oğuz KÖSE'ye

Uzmanlık eğitimim süresince kliniğimizde bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım değerli hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Meltem ZİHNİ KORKMAZ, Dr. Öğr. Üyesi Sevda KURT BAYRAKDAR ve Dr. Öğr. Üyesi Hatice YEMENOĞLU'na

Tez kapsamında titizlikle gerçekleştirilen biyokimyasal çalışmalar için Prof. Dr. Adnan YILMAZ ve Öğr. Gör. Kerimali AKYILDIZ'a ve histolojik çalışmalar için Prof. Dr. Levent TÜMKAYA ve Doç. Dr. Tolga MERCANTEPE'ye,

Beraber uyumla çalıŐtıđım, sevgi ve dostlukları ile destek olan tüm asistan arkadaşlarıma,

Varlıklarımı her daim yanımda hissettiğim Zeliha Betül GİRGİN, Merve KAYA ve Fatma EVİN'e,

Benim için gösterdikleri özveri ve inançlarıyla yetişmemde büyük emekleri olan, yoğun eğitim dönemim boyunca sabırla beni destekleyen sevgili anneme, babama ve kardeşlerime,

Sonsuz teşekkürler...

Büşra ÜNVER

ÖZET

Deneysel Periodontitisli Ratlarda Sistemik Melatonin Uygulamasının Periodontitis İlişkili Böbrek Hasarı Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

Amaç: Bu hayvan çalışmasının iki temel amacı periodontitisin böbrek yapı ve fonksiyonları üzerine muhtemel etkileri ile sistemik melatonin uygulamasının terapötik etkinliğini kapsamlı olarak araştırmak idi.

Materyal ve Metod: 24 erkek Sprague-Dawley ratı rastgele üç gruba ayrıldı: kontrol, deneysel periodontitis (Dp) ve Dp-Melatonin (Dp-Mel). Periodontitis, sağ-sol alt 1.molar dişlerin boyunlarına sub-paramarjinal pozisyonda 3.0 ipek suture yerleştirilmesi ve suturen yerinde 5 hafta süre ile muhafazası yoluyla indüklendi. Hemen takiben intraperitoneal olarak melatonin ve taşıyıcı (Kontrol ve Ep grupları) uygulamaları (10 mg/vücut ağırlığı/gün, 14 gün) gerçekleştirildi. Ratların ötenazisini takiben mandibular ve böbrek doku örnekleri alındı. Periodontal kemik kaybı histolojik ve mikrobilgisayarlı tomografik kesitlerle ölçüldü. Sağ böbrekte histopatolojik ve immünohistokimyasal, sol böbrekte ise biyokimyasal (MDA, GSH, OSİ, TNF- α , IL-1 β , MMP-8, MMP-9 ve KtD seviyeleri) değerlendirmeler yapıldı. Böbreklerin fonksiyonel durumu serum kreatinin, üre, sistatin C ve üre kreatinin düzeyleri ile analiz edildi.

Bulgular: Melatonin ligatürle indüklenen periodontal kemik kaybını belirgin olarak sınırladı (p<0,01). Periodontitisli ratların böbreklerinde belirgin olarak daha yüksek tespit edilen proinflamatuvar sitokinler (TNF- α ve IL-1 β), oksidatif stres (MDA ve OSİ) ve proteaz düzeylerini (MMP-8, MMP-9 ve KtD) ise baskıladığı tespit edildi (p<0,05). Bunun yanı sıra periodontitisle ilişkili histopatolojik bozulmalar ve apoptotik aktivite de Dp-Mel grubunda belirgin olarak daha düşük idi (p<0,05). Buna karşın, böbrek fonksiyonel belirteçlerinde Dp grubunda kontrol grubuna kıyasla hafif bir bozulma tespit edilmiş olup (p>0,05) melatoninin terapötik etkinliği ise sınırlı idi (p>0,05).

Sonuç: Melatonin periodontitis ilişkili inflamatuvar stres, apoptozis ve yapısal fakat fonksiyonel olmayan bozuklukları etkili bir şekilde sınırlandırabilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Böbrek, deneysel periodontitis, matrix metalloproteinaz, melatonin, oksidatif stres, periodontal-sistemik hastalık etkileşimleri



ABSTRACT

Investigation of the Effects of Systemic Melatonin Application on Periodontitis Related Kidney Injury in Rats with Experimental Periodontitis

Aim: Two main aims of this animal study were to inspect the possible effects of periodontitis on the structure and functions of the kidneys and the therapeutic effectiveness of melatonin.

Material and Methods: Twenty-four male Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups: control, experimental periodontitis (Ep), and Ep-melatonin (Ep-Mel). Periodontitis was induced by placing 3.0-silk sutures sub-paramarginally around the cervix of right-left mandibular first molars and maintaining the sutures for 5 weeks. Then melatonin (10 mg/kg bodyweight/day, 14 days), and the vehicle was administered intraperitoneally. Mandibular and kidney tissue samples were obtained following the euthanasia. Periodontal bone loss was measured via histological and microcomputed tomographic slices. On right kidney histopathological and immunohistochemical, and on the left kidney biochemical (MDA, GSH, OSI, TNF- α , IL-1 β , MMP-8, MMP-9, and CtD levels) evaluations were performed. Renal functional status was analyzed by levels of serum creatinine, urea, cystatin-C, and urea creatinine.

Results: Melatonin significantly restricted ligature-induced periodontal bone loss ($P < 0.01$) and suppressed the levels of proinflammatory cytokines (TNF- α and IL-1 β), oxidative stress (MDA and OSI), and proteases (MMP-8, MMP-9, and CtD) that was significantly higher in the kidneys of the rats with periodontitis ($P < 0.05$). In addition, periodontitis-related histological damages and apoptotic activity were also significantly lower in the Ep-Mel group ($P < 0.05$). However, the markers of renal function of the Ep group were detected slightly impaired in comparison with the control group ($P > 0.05$); and the therapeutic activity of melatonin was limited ($P > 0.05$).

Conclusion: Melatonin restricts the periodontitis-induced inflammatory stress, apoptosis, and structural but not functional impairments.

Keywords: Kidney, experimental periodontitis, matrix metalloproteinase, melatonin, oxidative stress, periodontal-systemic disease interactions



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrat derece
μA	: Mikroamper
μl	: Mikrolitre
μm	: Mikrometre
μm²	: Mikrometrekare
μmol	: Mikromol
8-OHdG	: 8-hidroksideoksi-guanozin
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ABH	: Akut böbrek hasarı
ABTS	: 2,2'-azino-bis
ADE	: Anjiyotensin dönüştürücü enzim
ADH	: Antidiüretik hormon
Agt	: Anjiyotensinojen
ANOVA	: Varyans analizi
Apaf-1	: Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1
B	: Bukkal
Bax	: Bcl-2 ile ilişkili x proteini
CCl₄	: Karbon tetraklorür
cm³	: Santimetreküp
CRP	: C reaktif proteini
CT	: Computed tomography
KtD	: Katepsin D
D	: Distal
DF	: Distal furkasyon

dk	: Dakika
dl	: Desilitre
DM	: Diabetes mellitus
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DOS	: Dişeti oluğu sıvısı
Dp	: Deneysel periodontitis
Dp-Mel	: Deneysel periodontitis-melatonin
DTNB	: 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoik asit
ELISA:	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EPO	: Eritropoetin
g	: Santrifüj kuvveti
GFH	: Glomerüler filtrasyon hızı
Gİ	: Gingival index
GnRH	: Gonadotropin salgılatıcı hormon
gr	: Gram
GSH	: Glutasyon
H&E	: Hematoksilen-Eozin
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HbA1c	: Hemoglobin A1c
ICAM-1	: Hücreler arası adezyon molekülü-1
IL-1	: İnterlökin-1
IL-1β	: İnterlökin-1 beta
IL-6	: İnterlökin-6
IL-8	: İnterlökin-8
INF-γ	: İnterferon gama

İ/R	: İskemi/Reperfüzyon
K₂HPO₄	: Dipotasyum hidrojen fosfat
KAK	: Klinik ataşman kaybı
Kaspaz	: Sistein aspartat spesifik proteaz
KAT	: Katalaz
KBH	: Kronik böbrek hastalığı
kcal	: Kilokalori
kg	: Kilogram
KH₂PO₄	: Potasyum hidrojen fosfat
KK	: Kemik kreti
kV	: Kilovolt
L	: Lingual
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
LOOH	: Lipit hidroperoksit
LPS	: Lipopolisakkarit
M	: Molar
MDA	: Malondialdehit
MDP	: Mikrobiyal dental plak
MF	: Meziyal furkasyon
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
MMP	: Matrix metalloproteinaz
MSB	: Mine sement birleşimi
MT	: Melatonin reseptörü

Na₂CO₃	: Sodyum karbonat
Na₂HPO₄	: Disodyum hidrojen fosfat
NaCl	: Sodyum klorür
NaH₂PO₄	: Monosodyum fosfat
NF-kβ	: Nükleer faktör kapa beta
ng	: Nanogram
NK	: Doğal öldürücü hücreler
nm	: nanometre
nmol	: nanomol
O₂	: Tekli oksijen
O₂⁻	: Süperoksit radikali
OD	: Optik yoğunluk
OH⁻	: Hidroksil radikali
OPG	: Osteoprotegerin
OSİ	: Oksidatif stres indexi
PBS	: Fosfat tamponlu salin
pg	: Pikogram
Ph	: Power of hydrogen
PİMK	: Patojenle ilişkili moleküler kalıplar
RANK	: Reseptör aktivatör nükleer faktör kapa B
RANKL	: Reseptör aktivatör nükleer faktör kapa B ligandı
RAS	: Renin anjiyotensin sistem
ROT	: Reaktif oksijen türleri
rpm	: Dakikada dönme sayısı
RTEÜ	: Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi

sn	: Saniye
SOD	: Süperoksit dismutaz
SSPS:	: İstatistiksel Analiz Yazılımı
TAOK	: Total antioksidan kapasite
TBA	: Tiyobarbitürik asit
TCA	: Tiyokarboksilik asit
TEP	: 1,1,3,3 tetrametahidroksi propan
Th1	: T helper 1
TIMP	: Matrix metalloproteinaz doku inhibitörü
TLR	: Toll-like reseptör
TNF-α	: Tümör nekroz faktörü
TOD	: Total oksidatif durum
VCAM	: Vasküler hücre adezyon molekülü

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 3.1. Ratlara ligatür bağlanması.....	49
Şekil 3.2. Sağ mandibular doku örneği ve 1. molar dişin etrafındaki ligatürün görünümü	51
Şekil 3.3. -80°C derin dondurucu	51
Şekil 3.4. MSB ve KK arasındaki mesafenin histomorfometrik ve radyografik ölçümü	53
Şekil 3.5. Süpernatantların ELISA kiti ile incelenmesi.....	61
Şekil 3.6. Eliza yıkayıcı cihaz	62
Şekil 3.7. Eliza okuyucu cihaz.....	62
Şekil 3.8. Doku takip cihazı.....	64
Şekil 3.9. Soğutma ünitesi ve parafin bloklama cihazı.....	65
Şekil 3.10. Rotary mikrotom cihazı.....	66
Şekil 3.11. Etüv	67
Şekil 3.12. Hematoksilen-Eozin boyama cihazı.....	67
Şekil 3.13. İmmunohistokimyasal boyama cihazı	70
Şekil 3.14. Renal korpus alan (μm^2) ölçümleri.....	72
Şekil 4.1. Mandibular 1.molar dişlerin periodontal kemik kayıplarının bukkolingual ve meziyodistal kesitlerde gösterimi	74
Şekil 4.2. Böbrek dokusu oksidatif stres parametrelerinin gruplar arasında karşılaştırılması	76
Şekil 4.3. İnflamatuar parametrelerin gruplar arasında karşılaştırılması.....	77
Şekil 4.4. Böbrek dokusunun ışık mikroskobu görüntüsü.....	79

Şekil 4.5. Böbrek doku kesitlerindeki apoptotik değişikliklerin ışık mikroskopunda görünümü 81



TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Periodontal ve peri-implant hastalık ve durumlarının sınıflandırılması	6
Tablo 2.2. Periodontitisin evreleri.....	11
Tablo 2.3. Periodontitisin derecelendirilmesi	12
Tablo 3.1. Deney hayvanlarına verilen standart pellet rat yeminin içeriği	47
Tablo 3.2. Biyokimya laboratuvarında kullanılan cihazlar ve marka adları	54
Tablo 3.3. Böbrek dokularına ait doku takip işlemleri.....	65
Tablo 3.4. Hematoksilen-Eozin ile Boyama Prosedürü	68
Tablo 3.5. İmmunohistokimyasal boyama prosedürü	71
Tablo 4.1. Alveoler kemik kayıplarının gruplar arasında karşılaştırılması.....	73
Tablo 4.2. Böbrek fonksiyon parametrelerinin gruplar arasında karşılaştırılması.....	78
Tablo 4.3. Kaspaz-3 pozitif nümerik yoğunluk ve renal korpüskül alan ölçümleri.....	80

1. GİRİŞ

Periodontitis periodonsiyumun yıkımı ile karakterize, ilerleyen dönemde dişlerin kaybı ile sonuçlanabilecek kronik inflamatuvar bir hastalıktır.^{1, 2} Bununla birlikte, günümüzde periodontitisin sadece dişlerin prognozu ve ağız sağlığı üzerine olumsuz etkilere sahip lokal etkili bir hastalık olmadığına yönelik pek çok kanıt sahibiz.^{3, 4} Periodontal orijinli bakteriler ve onların virülans etkenleri kan dolaşımı yoluyla direkt olarak veya çeşitli inflamatuvar mediyatörlerin yoğun olarak salınımına neden olması yoluyla indirekt olarak sistemik bir immuninflamatuvar duruma neden olmaktadır.³ Periodontitis ilişkili sistemik düşük dereceli kronik inflamatuvar durum başta akut ve kronik kardiyovasküler hastalıklar, diabetes mellitus (DM), romatoid artrit ve hamilelik olmak üzere pek çok hastalık ve durum üzerine olumsuz etkilere sahiptir.^{3,4}

Akut veya kronik inflamatuvar durumlar böbreklerdeki immuninflamatuvar cevapları da stimüle edebilmektedir.⁵ Literatüre bakıldığında, periodontitisin böbrek yapısı ve fonksiyonları üzerine muhtemel etkileri hususunun son yıllarda yoğun olarak irdelendiği anlaşılmaktadır.⁶⁻¹⁰ Eldeki bulguların büyük çoğunluğu periodontal kaynaklı inflamatuvar stresin böbrek fonksiyonlarında çeşitli düzeylerde bozulmalara neden olarak kronik böbrek hastalığı (KBH) riskini artırdığını göstermektedir.^{6, 11} Buna karşın, periodontitisin böbrek fonksiyonları üzerine etkisinin ise çok sınırlı olduğu tespit edilmiştir.^{8, 12} Tüm bu kanıtlar, inflamatuvar ve oksidatif durumlardan yapısal ve fonksiyonel olarak çeşitli düzeylerde etkilenebilen böbreklerin korunmasında immünmodulatör ve antioksidan özelliklere sahip ajanların faydalar sağlayabileceğini düşündürmektedir.^{10, 13, 14}

Melatonin normal koşullarda primer olarak pineal glandlar tarafından sentezlenip salınan temel fizyolojik fonksiyonu sirkadiyan ritimlerin düzenlenmesi olan bir

hormondur.¹⁵ Bunun yanı sıra güçlü antioksidan, immün düzenleyici ve antiinflatuar etkileri rapor edilmiştir.¹⁶⁻¹⁹ Serbest radikallerle direkt olarak savaşmasının yanı sıra antioksidan enzimler ile glutasyon (GSH) gibi non-enzimatik antioksidanların sentezini desteklemektedir.^{16, 20} Melatoninin, bir konak modülasyon ajanı olarak, kardiyovasküler hastalıklar, DM ve periodontitisin de dahil olduğu inflamatuvar orijinli pek çok hastalığın tedavisindeki rolü hususu güncel bir konudur.²¹⁻²³ Dahası, deneysel modellerde melatonin uygulamasının böbrek dokusundaki yapısal ve fonksiyonel hasarları sınırlandırdığı da gösterilmiştir.^{13, 16, 20, 24} Tüm bu bilgiler ışığında, her ne kadar periodontitisin böbrek yapı ve fonksiyonları üzerine etkisine yönelik bir literatür birikimi mevcut ise de, eldeki verilerin net bir kanıya vardırmaktan uzak olduğu açıktır.^{8, 10, 12} Dahası, periodontitis ilişkili muhtemel böbrek hasarının tedavisinde melatoninin rolüne yönelik bulgular ise çok sınırlıdır.¹⁰ Bu bağlamda, sunulan hayvan çalışmasında hem periodontitisin böbrek yapı ve fonksiyonları üzerine muhtemel etkilerini hem de sistemik melatonin uygulamasının tedavi edici etkinliğini kapsamlı olarak araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Periodontal Hastalıklar

Periodontal hastalık, dişlerin kaybı ile sonuçlanabilecek destek doku yıkımları ile karakterize infeksiyöz orjinli kronik inflamatuvar bir hastalıktır.¹ Bu hastalıklarda klinik olarak bağ dokusu kaybı, alveoler kemik rezorpsiyonu ve periodontal cep formasyonu görülmektedir.²⁵ Periodontal hastalıkların oluşmasında majör etyolojik faktör mikrobiyal dental plak (MDP) ve klinik olarak plağa bağlı oluşan gingivitis en sık görülen periodontal hastalıktır.²⁶

Gingivitis terimi, basitçe dişeti iltihabını ifade etmektedir.²⁷ Klinik olarak dişetinde hiperemi ve ödemle karakterize, epitelyal ataşmanda ve alveoler kemikte kaybın görülmediği bir hastalıktır.²⁸ Başlangıçta MDP'ye cevap olarak oluşan gingivitis, tedavi edilmediğinde periodontitise dönüşebilir. Periodontitis; dişeti, alveoler kemik ve periodontal ligamentte yıkım ile kendini gösteren, multifaktöriyel, polimikrobiyal kronik inflamatuvar bir hastalıktır.²⁹ Doku yıkımı MDP'deki bakterilerin virülans faktörleri ile buna cevaben gelişen konak immunoinflamatuvar cevabı arasındaki karmaşık etkileşimlerin bir sonucudur.^{3, 30} Periodontitis daha çok yetişkinlerde teşhis edilir ancak çocuklarda ve ergenlerde de görülebilir.³⁰

Epidemiyolojik çalışmalar incelendiğinde, periodontitisin şiddetli formlarının dünya nüfusunun %10-15'ini etkilediği ve bu oranın yaşla birlikte arttığı görülmektedir.^{30, 31} Ülkemizde yapılan çalışmalarda ise 35-44 yaş aralığındaki bireylerin %43'ünde, 65 yaş ve üstü bireylerin ise %91'inde 3 mm ve daha fazla ataşman kaybı olduğu rapor edilmiştir.³²

2.1.1. Periodontal Hastalıkların Sınıflandırılması

Periodontal hastalıklar günümüze kadar farklı şekillerde sınıflandırılmıştır. Uluslararası Periodontoloji Çalıştay'ında 1999 yılında kabul edilen sınıflama²⁶ Amerikan

Periodontoloji Akademisi ve Avrupa Periodontoloji Federasyonu'nun katkılarıyla 2017 yılında değiştirilerek yenilenmiştir. Yeni periodontal sınıflandırma; periodontal sağlık, dişeti hastalıkları ve durumları, periodontitis ve periodonsiyumu etkileyen diğer durumlar olmak üzere üç ana başlık altında toplanır. Periodontitisin sınıflandırılması ise hastalığın patofizyolojisine uygun olarak 3 başlık altında incelenir. Bunlar; periodontitis (1999 yılında kabul edilen eski sınıflamadaki agresif ve kronik formlar kaldırılıp tek çatı altında toplanmıştır), nekrotizan periodontitis ve sistemik hastalıkların belirtisi olarak periodontitis şeklindedir (Tablo 1).³³

2.1.2. Periodontal Sağlık

Periodontal sağlık, bireyin herhangi bir periodontal hastalık geçirmemesi veya geçmişte periodonsiyuma hasar veren herhangi bir periodontal hastalık hikayesinin olmaması şeklinde tanımlanmaktadır.³⁴ Literatürde periodontal sağlıkla ilgili iki farklı terimden bahsedilir. Birincisi bozulmamış klinik sağlık terimidir. Bozulmamış klinik sağlık, klinik olarak ataşman kaybı ve sondlamada kanamanın görülmediği, sondlanan cep derinliğinin en fazla 3mm olduğu, eritem, ödem ve püy varlığının gözlenmediği; histolojik olarak da periodonsiyumda inflamasyon bulgularının görülmediği durumdur. Bozulmamış klinik sağlık pek mümkün olmamakla birlikte, klinik sağlık terimi daha sık karşılaştığımız bir durumdur. Klinik sağlık, anatomik olarak sağlam bir periodonsiyum veya azalmış periodonsiyumda, klinik olarak periodontal inflamasyonun olmaması veya anlamlı olarak azalması, dişeti oluğu sıvısında (DOS) da inflamatuvar belirteçlerin yokluğu veya çok düşük miktarda bulunması şeklinde kabul edilmektedir.³⁵

Azalmış periodonsiyum için tanımlanan gingival sağlık durumu stabil periodontitis ve non-periodontitis olarak ikiye ayrılır. Stabil periodontitis; periodontitisin tedavi edildiği, sondlamada kanama, eritem, ödem, derin ceplerin olmadığı, ancak

ataşman kaybı ve kemik kaybının olduğu durumu ifade ederken, non-periodontitis; dişeti çekilmesi olan veya kron boyu uzatma işlemi yapılan hastalar için ifade edilmektedir.³⁴

Azalmış periodonsiyumlu hastaların önceden geçirdikleri periodontal hastalık sebebiyle alveol kemiğinde yıkım mevcut olup tanı için radyografik değerlendirme oldukça önemlidir. Fakat bu hastalarda yalnızca radyografik bulgular ile periodontal sağlıklı veya değil şeklinde karar verilmemeli, klinik muayene ile birlikte değerlendirme yapılmalıdır.³⁵

2.1.3. Mikrobiyal Dental Plak ile İlişkili Gingivitis

Dişetinde çeşitli düzeylerdeki eritem ve ödeme ek olarak, sondlamada veya spontan kanamaların olduğu, DOS artışının görüldüğü, radyografik olarak kemik kaybının olmadığı periodontal bir hastalıktır. Sondlamada kanama ve DOS artışı hastalığın ilk klinik bulgularıdır.³⁶ Semptomlar serbest ve yapışık dişeti ile sınırlı olup, mukogingival hattı geçmemektedir.³⁷

Gingivitiste doğrudan diş kayıpları görülmez fakat hastalığın periodontitise geçişini önlemek için tedavi son derece önemlidir.³⁸ Oral hijyene dikkat edildiği takdirde gingivitis geri döndürülebilmektedir.³⁹ Bu yüzden bu hastaların tedavisinde plak kontrolü gerçekleştirilerek oral hijyenlerine dikkat etmeleri sağlanmalıdır.⁴⁰

Tablo 2.1. Periodontal ve peri-implant hastalık ve durumlarının sınıflandırılması

Periodontal ve Peri-implant Hastalık ve Durumlarının Sınıflandırılması										
Periodontal Hastalıklar ve Durumlar										
Periodontal sağlık, gingival hastalıklar ve durumlar			Periodontitis			Periodonsiyumu etkileyen diğer durumlar				
Periodontal sağlık ve gingival sağlık	Dental biyofilmlle ilişkili gingivitis	Dental biyofilmlle ilişkili olmayan gingival hastalıklar	Nekrotizan periodontal hastalıklar	Periodontitis	Sistemik hastalığın bir belirtisi olarak periodontitis	Sistemik hastalıkların veya durumların periodontal destek dokuları etkilemesi	Periodontal apseler ve endodontik periodontal lezyonlar	Mukogingival deformiteler ve durumlar	Travmatik oklüzal kuvvetler	Diş ve protezle ilişkili faktörler
Peri-implant Hastalıklar ve Durumlar										
Peri-implant sağlık	Peri-implant mukozitis	Peri-implantitis	Peri-implant yumuşak ve sert doku eksiklikleri							

2.1.4. Mikrobiyal Dental Plak İle İlişkili Olmayan Gingivitis

Biyofilmden bağımsız gingival hastalıklar, plaktan kaynaklanmayan ve genellikle plak uzaklaştırıldıktan sonra sorunun çözülmediği durumlardır. Bakteriyel, viral ve fungal enfeksiyonlar, genetik hastalıklar, travmatik lezyonlar, fiziksel, kimyasal ve termal yaralanmalar, gingival pigmentasyon, kontakt alerji, mukokutanöz hastalıklar, dişetlerindeki maligniteler, vitamin C eksikliği gibi lokal veya sistemik durumlar bu başlık altında ele alınabilir.³⁴

2.1.5. Periodontitis

Periodontitis, mikrobiyal dental plak ile ilişkili periodontal ataşman kaybına neden olan, ilerleyen aşamalarda periodontal desteğin zayıflamasıyla birlikte diş kayıpları ile sonuçlanabilen, kronik, multifaktöriyel inflamatuvar bir hastalıktır.³⁸ Bu hastalık geri dönüşümü mümkün olmayan doku yıkımı ile karakterizedir. Hastalığın patofizyolojisinde, doku yıkımına sebep olan konak kaynaklı proteinazların aktivasyonu söz konusudur. Yıkım sonucunda bağlantı epitelinin apikale göçü gözlenmekte ve

bakteriyel biyofilmin daha da apikale yayılması ve kolonize olmasıyla hastalık ilerlemektedir.⁴¹

2017 Dünya Periodontoloji Çalıştayı'na göre periodontitisin tanımı;

- Komşu olmayan 2 veya daha fazla dişte interdental ataşman kaybının olması veya,

- 2 veya daha fazla dişte 3 mm'den fazla periodontal cep gözlenmesi ile birlikte bukkal/lingual klinik ataşman kaybının 3 mm veya daha fazla olması şeklinde yapılmıştır.⁴¹

Periodontitisin klinik bulguları; supra ve subgingival plak birikimi, dişetinde inflamasyon bulguları (eritem, ödem, sondlamada kanama vb.), sondlamaya karşı periodontal dokuların direncinde azalma, cep oluşumu, periodontal ataşman ve kemik kaybı sayılabilir. Ayrıca bazı durumlarda dişeti çekilmesi, dişeti büyümesi, kök ve furkasyon bölgelerinin açığa çıkması, süpürasyon ve artmış diş mobilitesi de görülebilmektedir. Hastalık genellikle ağrısızdır fakat açığa çıkmış kök yüzeyleri varlığında bazen sıcağa veya soğuğa karşı hassasiyet görülebilmektedir.⁴²

2017 yılında gerçekleştirilen yeni sınıflandırmada patofizyolojiye dayanarak üç farklı periodontitis formu tanımlanmıştır;

1-Nekrotizan periodontitis

2-Sistemik hastalıkların bulgusu olarak periodontitis

3-Periodontitis (kronik veya agresif form şeklinde ayrılmayıp tek çatı altında toplanmıştır)

2017 Dünya Periodontoloji Çalıştayı, periodontitisin evreleme ve derecelendirme şeklinde sınıflandırılmasında karar kılmıştır. Evreleme; dişlerin sondlanan cep derinliği,

klirik ataşman kayıpları (KAK) , alveol kemik kaybı miktarı ve yüzdesi, açısal kemik defekt varlığı ve varsa şiddeti, furkasyon tutulumu, diş mobilitesi ve periodontitis kaynaklı diş kaybı mevcudiyeti gibi birçok faktöre bakılarak gerçekleştirilmektedir. Yani evrelemede birçok faktör birlikte değerlendirilerek periodontal hastalığın şiddeti belirlenmektedir. Derecelendirme ise hastanın genel sağlığı, periodontal hastalık geçmişi, periodontal hastalık ilerleyişi, sigara kullanımı ve DM gibi faktörler göz önünde bulundurularak gerçekleştirilmektedir. Derecelendirme hastanın risk değerlendirmesine imkan sağlamaktadır. Evreleme 4 kategoriye (evre I, II, III ve IV), derecelendirme ise 3 kategoriye (A, B ve C) ayrılmıştır.^{33, 41, 43}

Evre I Periodontitis: Gingivitisten periodontitise geçişin ilk aşamasıdır. Yani gingivitis ile periodontitis arasındaki sınır olarak kabul edilmektedir. Evre I periodontitisi olan hastalar, dişeti iltihabı ve dental plağın ağızdaki devamlılığına yanıt olarak periodontitis geliştirmiştir. Hastalık, erken teşhis edilir ise geleneksel mekanik yöntemler ve oral hijyen prosedürleri uygulanarak kontrol altına alınabilir. Diş hekimliğinde hastalığı erken teşhis etmek zordur. Bunun sebebi ise teşhiste altın standart olarak kabul edilen periodontal sondlamanın, erken klinik ataşman kaybını belirlemede yetersiz kalmasıdır. Sondlanan cep derinliğinin yanında tükürük biyobelirteçlerinin değerlendirilmesi ve yeni görüntüleme tekniklerinin kullanılması, evre I periodontitisin erken teşhis edilmesine yardımcı olabileceği düşünülmektedir.⁴¹

Evre I periodontitis hastalarında;

- İnterdental alanda ataşman kaybı 1-2 mm olup sondlama derinliği en fazla 4mm'dir.
- Koronal üçlüde %15'i geçmeyen radyografik kemik kaybı vardır ve genellikle horizontaldir.
- Periodontitis sebebiyle kaybedilmiş diş yoktur (Tablo 2.2).⁴¹

Evre II Periodontitis: Evre II periodontitis, yerleşik periodontitisi temsil etmektedir. Hastalık sürecinin bu aşamasında birçok vakada, standart tedavi prensiplerinin uygulanması ve hastanın düzenli profesyonel ağız bakımını gerçekleştirmesi ile hastalığın ilerlemesini durdurmak mümkündür. Evre II hastalarının standart tedavi yöntemlerine verdiği cevabın dikkatle değerlendirilmesi önemlidir. Hastalığın şiddeti ve hastanın tedaviye verdiği yanıt, hekim için daha yoğun tedavi gereksiniminin sinyalleri olarak kabul edilebilir.⁴¹

Evre II periodontitis hastalarında;

- İnterdental alanda ataşman kaybı 3-4 mm olup sondlama derinliği en fazla 5mm'dir.
- Koronal üçlüde %15-33 arasında radyografik kemik kaybı vardır ve genellikle horizontaldir.
- Periodontitis sebebiyle kaybedilmiş diş yoktur (Tablo 2.2).⁴¹

Evre III Periodontitis: Periodontitisin bu evresinde periodontal ataşman ciddi zarar görmüştür. Kapsamlı tedavi yapılmadığında diş kayıpları görülebilir. Bu evre, kökün orta üçlüsüne kadar uzanan periodontal yıkımlar, derin kemik içi defektler, furkasyon tutulumu, periodontal diş kaybı ve implantın yerleştirilmesini zorlaştıran alveolar kemik defektlerinin varlığı ile karakterizedir.⁴¹

Evre III periodontitis hastalarında;

- Klinik ataşman kaybı 5 mm veya daha fazladır.
- Radyografik olarak kökün orta veya apikal üçlüsüne uzanan kemik kayıpları görülür.
- Orta seviyede alveoler kret defektleri mevcuttur.
- Periodontal sebeplerle kaybedilen diş sayısı en fazla 4 tür.
- Sondlanan cep derinliği en az 6 mm, vertikal kemik kaybı en az 3 mm dir.

- Sınıf II veya sınıf III furkasyon defektleri görülebilir.
- Diş kaybı görülebilmesine rağmen, çiğneme fonksiyonu korunur ve fonksiyonu düzeltmek için karmaşık tedavilere ihtiyaç yoktur (Tablo 2.2).⁴¹

Evre IV Periodontitis: Periodonsiyumun büyük ölçüde zarar gördüğü ve çiğneme fonksiyonunu etkileyecek düzeyde diş kayıplarının olduğu ileri evre periodontitistir. Hastalığın kontrol altına alınamaması durumunda diş kayıpları görülmeye devam edecektir. Bu evre, kökün neredeyse apikal kısmına kadar uzanan yıkımla ve hastalarda çoklu diş kaybı öyküsüne sebep olan derin periodontal lezyonların varlığı ile karakterizedir.

Evre IV periodontitis hastalarında;

- Ataçman kaybı 5mm'den fazladır.
- Radyografik olarak kökün orta veya apikal üçlüsüne uzanan kemik kayıpları görülebilmektedir.
- Periodontal sebeple diş kaybı en az 5'dir ve kalan diş sayısı 20'den azdır.
- Sekonder oklüzal travma ve kemik defektlerine bağlı dişlerde hipermobilité ve posterior kapanışın bozulması sıklıkla görülür.
- Çiğneme fonksiyonunun stabilizasyonu ve restorasyonu gereklidir (Tablo 2.2).⁴¹

Evresine bağlı olmaksızın periodontitisin ilerleyiş hızı bireyler arasında farklılık gösterebilmektedir.⁴¹ Sigara, DM, obezite, genetik faktörler, fiziksel aktivite veya beslenme gibi bilinen risk faktörleri periodontitisin ilerleme hızını etkiler ve sonuç olarak bir evreden diğerine geçişi hızlandırabilir.⁴⁴ Hastalık ilerleyişini arttıran veya tedaviye yanıtı azaltan bu risk faktörleri, diş kayıpları ile de ilişkilendirilmiştir. Bu faktörlerin önceden sorgulanması ile periodontitisin ilerleme hızının ve hastanın diş kaybı riskinin tahmin edilebileceği gösterilmiştir.⁴¹ Derecelendirme, dişlerin kök uzunluğuna göre

radyografik kemik kayıplarının ölçülmesiyle (yüzde olarak), hastanın yaşı ve mevcut kemik kaybı arasındaki ilişkinin risk tayinini belirlemek için yapılmaktadır.⁴⁴

Tablo 2.2. Periodontitisin evreleri

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

Derece A: Hastalık yavaş seyirli olup 5 yıldan fazla süreli takipte radyografik olarak kemik kaybı veya klinik ataşman kaybı izlenmemektedir. Kemik kaybı yüzdesinin yaşa oranı 0.25'ten daha az olduğu görülmektedir. Dental plak miktarı fazla olmasına rağmen yıkım çok düşük seviyededir. Bu bireylerde sigara ve DM hikayesi yoktur (Tablo 2.3).⁴¹

Derece B: Hastalık orta derecede ilerleme hızına sahiptir ve 5 yıldan fazla süreli takipte 2 mm'den az radyografik kemik kaybı veya klinik ataşman kaybı görülmektedir. Kemik kaybı yüzdesinin yaşa oranı 0.25 ile 1 arasında ölçülür. Dental plak birikimiyle orantılı olarak kemik yıkımı mevcuttur. Günde 10 adetten az sigara kullanımı olup DM hastalarında HbA1c %7'den düşüktür (Tablo 2.3).⁴¹

Derece C: Hastalık hızlı ilerlemektedir ve 5 yıldan fazla süreli takipte en az 2 mm'lik radyografik kemik kaybı veya klinik ataşman kaybı görülmektedir. Kemik kaybı yüzdesinin yaşa oranı 1'den fazla ölçülür. Dental plak miktarına göre periodontal yıkım beklenenden daha fazladır. Günde 10 adet veya daha fazla sigara kullanımı olup DM hastalarında HbA1c %7 veya daha fazladır (Tablo 3).⁴¹

Tablo 2.3. Periodontitisin derecelendirilmesi

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

2.1.5.1. Periodontitis Patogenezi

Periodontitis, periodonsiyumdaki bakteriyel ürünler, çok sayıda hücre popülasyonu ve inflamatuvar mediyatörler arasındaki etkileşim ile oluşan kronik inflamatuvar bir hastalıktır. Genel olarak periodontitisin, dişler üzerinde biriken kompleks mikrobiyal dental biyofilm tarafından başlatıldığı kabul edilir.⁴⁵ Periodontal hastalıklara sebep olan bu bakteriyel kaynaklı faktörler ve antijenler lokal inflamatuvar reaksiyonu başlatır ve doğal bağışıklık sistemini harekete geçirir. Oral kavitede kolonize olan bakteri türlerinin bazıları periodontitis ile ilişkilidir ve hastalığa zemin hazırlayan bu bakteriler periodontopatojen olarak tanımlanır.⁴⁶

Periodontal hastalıklarda meydana gelen doku yıkım sürecine genel olarak bakıldığında mikroorganizmalar ile konak cevabı arasındaki dengenin bozulmasıyla periodontal doku yıkımının gerçekleştiği görülmektedir.⁴² Mikrobiyota ve konak arasındaki dengenin değişmesi, ya konak yanıtının bozulması (ör; kontrolsüz DM) ya da mikrobiyal yükün artmasıyla (ör; oral hijyen prosedürlerine uyulmaması) gerçekleşmektedir.⁴⁵ Yapılan çalışmalarda bakteri akümülyasyonuna karşı oluşan inflamatuvar cevabın her bireyde aynı şiddette olmadığı bazı bireylerde bu cevap minimal düzeydeyken bazı bireylerde ise oldukça belirgin olduğu rapor edilmiştir. Bu durum bireyler arasında değişen konak yanıtının önemini göstermektedir.⁴² Doku yıkım sürecine ayrıca lokal faktörler (plak birikimi, taşkın restorasyonlar, subgingival bölgeye uzanan çürük lezyonları, diştaşı, furkasyon bölgesi açığa çıkmış dişler, malokluzyon, kök oluk ve konkavite), sistemik faktörler (DM), çevresel/davranışsal faktörler (sigara, stres) ve genetik faktörler rol oynamaktadır.⁴²

Klinik ve histopatolojik olarak gingivitis ve periodontitis gelişimi 1976 yılında Page ve Schroeder tarafından histopatolojik olarak başlangıç, erken, yerleşmiş ve ilerlemiş lezyon olmak üzere 4 başlık altında toplanmıştır.⁴⁷

Başlangıç Lezyonu: Plak birikiminin başlamasından sonraki 2-4 gün içinde meydana gelen histolojik tablodur. Klinik olarak sağlıklı dişeti dokularında görülen ve sadece histolojik olarak farkedebildiğimiz bir durumdur. Bu aşamadaki lezyon düşük dereceli inflamasyon, vasküler ağın genişlemesi ve artmış vasküler geçirgenlik ile tanımlanır. Artan bu geçirgenlik sonucunda nötrofiller ve monositler bağ dokusundan geçerek kemotaktik uyarının kaynağına, yani dişeti sulkusundaki bakteri ürünlerine doğru göç eder. Vasküler sıvı çıkışının artmasıyla DOS artışı görülür.⁴²

Erken Lezyon: Dişeti iltihabının erken klinik bulgularına karşılık gelen bu lezyon plağın birikmesini takiben 4-7 gün içinde gelişir. Dişeti, kapiller ağın çoğalması, önceden aktif olmayan kapiller yatakların açılması ve vazodilatasyon sonucunda eritamatöz görünümündedir. Artan vasküler geçirgenlik, DOS artışına yol açar. Bu evrede DOS'un tipi interstisyel sıvıdan inflamatuvar eksudaya doğru değişir. Nötrofillerin sayısının artmasının yanısıra baskın hücre tipi nötrofilden lenfositlere (özellikle T lenfositleri) doğru kaymaya başlar. Fibroblastlar mevcut alanı arttırmak için apoptoz yoluyla dejenere olur ve kollojen yıkımı meydana gelir. Dişeti dokularında biriken ödemin bir sonucu olarak, dişeti biraz şişmiş görünür ve buna bağlı olarak dişeti sulkusu biraz daha derinleşir. Subgingival biyofilm bu durumdan yararlanır ve dişin apikaline doğru çoğalmaya başlar. Böylece etkili plak kontrolü daha zor hale gelir. Erken dişeti lezyonu süresiz olarak devam edebilir veya daha da ilerleyebilir.^{42, 48}

Yerleşmiş Lezyon: Klinisyenlerin "kronik gingivitis" olarak adlandırdığı bu tablo plak birikiminin başlangıcından itibaren 14-21. gün civarında ortaya çıkmaktadır.⁴⁸ Erken lezyonun yerleşmiş lezyona doğru ilerlemesi birçok faktöre bağlıdır. Yapılan çalışmalarda, inflame bağ dokusunun önemli hacmini inflamatuvar hücrelerin (plazma hücreleri, lenfositler, nötrofiller) işgal ettiği görülmüştür. Nötrofiller dokularda birikir ve lizozomal içeriklerini hücre dışına bırakırlar. Böylece daha fazla doku tahribatı görülür.

Cep epiteli ülsere olur ve periodontal sondun geçişine daha az direnç gösterir. Bu nedenle sondlamada kanama kronik gingivitisin karakteristik bir özelliğidir.⁴² Kollojen yıkımı devam etmesine rağmen kemik rezorpsiyonu bu lezyon tipinde görülmez.⁴⁹ Etkili plak kontrolü yeniden sağlanırsa, bu inflamatuvar değişiklikler tamamen geri dönebilir.⁴²

İlerlemiş Lezyon: Kronik gingivitisten periodontitise geçişin olduğu lezyon tipidir. Histolojik incelemelerde, periodontal ligament ve alveolar kemiğe kadar uzanan kollojen yıkımı söz konusudur. Nötrofiller periodontal cep içinde ve cep epitelinde, plazma hücreleri ise bağ dokusunda baskındır. Bağlantı epiteli, sağlam epitel bariyerini korumak için kök yüzeyi boyunca apikale doğru göç eder.⁴² Dişe tutunan bağ dokusu ataşmanında meydana gelen kayıp periodontitisi gingivitisten ayıran en önemli özelliktir.⁵⁰ Kemik dokusu, bakterilerin kemiğe yayılmasını önlemek için bir savunma mekanizması olarak inflamatuvar alandan geri çekilmeye başlar ve böylelikle osteoklastik aktivite görülür. Cep derinleştikçe, plak bakterileri apikal olarak bir niş içinde çoğalır ve periodontopatojenler için oldukça elverişli bir ortam haline gelir. Cep, hazır bir besin kaynağı ile korunan, sıcak, nemli ve anaerobik bir ortam sunar ve bakteriler vücut dışında (periodontal cepte) olsalar bile, inflamatuvar yanıtla ortadan kaldırılamazlar. Böylece, kronik inflamasyonla ilişkili doku hasarının devam ettiği bir döngü gelişir. Ağız hijyeni teknikleri bakterileri çıkartmak ve biyofilmi bozmak için yetersiz kalır ve böylece döngü devam eder.⁴²

2.1.5.1.1. Periodontal İnflamasyon

İnflamasyon, mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonlar veya fiziksel yaralanma sonucunda başlatılan koruyucu bir yanıttır.^{51, 52} Bir yaralanma veya enfeksiyona cevaben akut inflamasyon hemen oluşur ve genellikle kısa ömürlüdür. İnflamasyon çözülmeden kaldığı zaman kronikleşir ve doku tahribatı ile iyileşme süreci bir denge haline gelir. Ancak denge hassastır ve her an yıkıma doğru değişim

gösterebilir.⁴⁵ İnflamatuvar yanıtın tipi ve derecesi, olayı tetikleyen mikroorganizmanın (bakteriyel, viral veya parazitik) doğasına ve kalıcılığına bağlıdır.⁵³

Periodontal hastalıklarda görülen doku yıkım mekanizmaları hala tam anlamıyla açıklığa kavuşmamıştır. Fakat, periodontopatojenlerin kendisinin ya da ürünlerinin direkt doku yıkımını gerçekleştirdiği ve bu bakterilere karşı oluşan konak savunma mekanizmasının periodontal hastalığın ilerlemesine neden olduğu kabul edilen görüştür. Hatta günümüzde inflamatuvar konak cevabının periodontal doku yıkım sürecinde daha fazla hasara sebep olduğu kabul edilmektedir.^{49, 54} Lipopolisakkaridler (LPS), antijenler ve diğer virülans faktörleri biyofilmden salınıp gingival dokuya erişim sağlar ve konak savunma hücrelerinin aktivasyonuna yol açarak inflamatuvar ve immün yanıtı başlatır. Hücresel aktivasyonun bir sonucu olarak inflamatuvar mediyatörler (sitokinler, kemokinler, araşidonik asit metabolitleri, proteolitik enzimler vb.) ortama salınarak doku tahribatına ve kemik rezorpsiyonuna neden olurlar.⁴⁵

Konak savunma mekanizması; inflamasyona karşı başlangıç savunmasını oluşturan doğal immüniteden ve daha sonra katılan, inflamasyona karşı daha özgül bir savunma sağlayan kazanılmış immüniteden oluşmaktadır. Doğal immün sistem ilk savunma hattını oluşturur ve başlangıç inflamasyonu sitokinler, kemokinler, fagositik hücreler (makrofajlar, nötrofiller, dentritik hücreler) ve doğal öldürücü hücreler (NK) aracılığıyla gösterir.⁵⁵ Kazanılmış immünite ise, belirli mikroorganizmalara ve toksinlere karşı lenfositleri ve özgül antikorları hazırlayan bir sistemdir. Antijene özgül T ve B lenfositler primer rol oynar. T lenfositler farklılaşarak antijen sunan, yardımcı ve sitotoksik T lenfositleri olarak ortamda bulunurken, B lenfositleri ise hücre dışı mikroorganizmaları yok edebilmek için immünglobulinleri salgılar. Bu olaylarla birlikte konağın kontrolü altında doku yıkımı süreci başlamış olur.⁵⁶

Doğal immun yanıt; patojenler üzerinde eksprese edilen patojenle ilişkili moleküler kalıpların (PİMK) toll-like reseptörleri (TLR) tarafından tanınmasıyla başlar. TLR'ler, patojenleri tanıyıp konak savunmasını ve inflamatuvar fazı başlatmada önemli rolleri olan reseptörlerdir.⁵⁷ Bu TLR'lerin PİMK'lara bağlanması, inflamatuvar sitokinlerin, kemokinlerin, prostaglandinlerin ve lökotrienler gibi proinflamatuvar lipid mediyatörlerinin üretimini indükler. Bir dizi olay boyunca mast hücreleri, tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) ve vazoaktif aminleri serbest bırakmak üzere uyarılır. TNF- α , hücreler arası adezyon molekülü-1 (ICAM-1) ve P-selektin gibi adezyon moleküllerinin ekspresyonunu artırır. Yerleşik hücrelerden inflamatuvar mediyatörler salınmaya başlar. Epitel hücrelerinden kan damarlarındaki monosit ve nötrofilin adezyonunu ve göçünü sağlayan interlökin (IL)-8 (IL-8) üretilir.^{45, 46} Bu evre vasküler dilatasyon, vasküler geçirgenlikte artış ve inflame alanda lökosit birikiminin görülmesi ile karakterizedir. Bölgede toplanan lökositler, (tipik olarak görülen nötrofillerdir) esas olarak fagositoz yapar ve farklı hücre içi öldürme mekanizmaları yoluyla yabancı mikroorganizmaları ortadan kaldırır.⁵¹ Lökositler lizozomal enzimlerini serbest bırakır ve dişeti dokusunun bozulmasına sebep olur.⁴⁵ Periodontal dokulara gelen nötrofiller IL-1, IL-6 ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokin üretimini artırmaktadır. Bu sitokinler kemik rezorpsiyonunu uyarak periodontal doku yıkımına aracılık eder.⁴⁶

İnflamatuvar mediyatörlere yanıt olarak oluşan matriks metalloproteinaz (MMP) seviyelerindeki artış bu bozunmaya katkı sağlar.⁴⁵ Proteolitik enzimler olan MMP'ler ve onun doku inhibitörleri (TIMP), sağlıklı dokuda hücre dışı matriksin homeostazisini sağlamakla birlikte, inflamatuvar hastalıklarda kilit rol oynar. Sitokinleri ve bunların reseptörlerinin aktivitelerini düzenler. Periodontitiste hem konak hem de bakteri türevli proteolitik enzimler bağ dokusunun hücre dışı matriksinin bozulmasına neden olur.⁴⁵ Böylece bağ dokusu ataşmanı ve alveoler kemik yıkılır ve bağlantı epiteli apikale göç

eder.⁵⁷ MMP sentezlenmesi ve aktivitesi, periodonsiyumda inflamasyon yoksa genel olarak düşüktür, fakat inflamasyon varlığında inflamatuvar sitokinlerin artışıyla MMP sentezi de artar.⁴⁵ MMP ler arasında MMP-8 ve MMP-13 ün periodontal hastalık şiddetiyle ilişkisi olduğu gösterilmiştir.^{58,59} Yapılan in vitro çalışmalarda IL-1 β , TNF- α ve bakteriyel LPS, gingival fibroblastlarda MMP-1, MMP-3, MMP-8 ve MMP-9 un ekspresyonunu artırmaktadır.⁶⁰⁻⁶³

2.1.5.1.2. Kemik Kaybında Rol Oynayan Sitokinler

Normal fizyolojik koşullar altında kemik rezorpsiyonu ve oluşumu arasında bir denge vardır. Bu denge, yapısal olarak bütünlüğü ve kemik homeostazisini sağlar.⁶⁴ Periodontitisin ilerlediğini gösteren en önemli belirteç alveolar kemik kaybının gözlemlenmesidir. Periodontopatojen bakterilere karşı oluşan lokal immün yanıt, kemiğin homeostatik dengesini bozmakta ve kemik rezorpsiyonuna neden olmaktadır.⁵⁷

Osteoklastların aktivasyonu ve farklılaşması, TNF ligandı ve reseptör süper ailesinin üyeleri olan reseptör aktivatör nükleer faktör kappa B (RANK), RANK ligandı (RANKL), ve osteoprotegerin (OPG) tarafından düzenlenir.⁵⁷ RANKL, osteoblastlar, fibroblastlar, T ve B lenfositleri başta olmak üzere birçok hücre tarafından üretilir.⁴⁶ RANKL, osteoklast ve preosteoklast hücre yüzey reseptörü olan RANK'a bağlandığında farklılaşmayı ve proliferasyonu sağlayarak osteoklastik aktiviteyi uyarır. Osteoblastlar, fibroblastlar ve kemik iliği stromal hücreleri tarafından üretilen bir tuzak reseptörü olan OPG, RANKL'a bağlanarak RANKL-RANK birleşimini engelleyerek osteoklast oluşumunu inhibe eder.⁵⁷ Periodontitis vakalarında RANKL ekspresyonundaki artışın, RANKL/OPG oranını artırdığı ve makrofaj öncü hücrelerinin osteoklastlara farklılaşmasını uyardığı gösterilmiştir.⁶⁴ İnflamasyonun ve mikrobiyal plağa karşı konak yanıtının düzenlenmesi, RANKL/OPG oranının ve dolayısıyla kemik yıkımının azalmasını sağlamak periodontal tedavide hedeflenen sonuçlardır.⁶⁴

2.1.5.1.3. Reaktif Oksijen Türlerinin Periodontitis Patogenezindeki Rolü

Reaktif oksijen türleri (ROT) moleküler oksijenden kaynaklanan kimyasal reaktif moleküllerdir.⁶⁵ Organizmada serbest radikallerin oluşumu ve bunların ortadan kaldırılması fizyolojik olarak sürekli bir denge içerisinde. Fakat ROT'un fazla miktarda üretilmesi ve/veya antioksidan mekanizmanın yetersiz kalması sonucu bu denge bozulur ve oksidatif stres meydana gelir.⁶⁶ Oksidatif stres doku homeostazı ve hücrel fonksiyonlar açısından hayati öneme sahip membran lipidleri, proteinleri ve DNA gibi biyomoleküllerde önemli hasarlara neden olmaktadır.²

Kronik inflamatuvar yanıt ROT'un çok miktarda üretildiği önemli bir hadisedir. Periodontitis gibi kronik inflamatuvar hastalıkların oksidatif stres ile ilişkili olduğu ve fagositozdan sonra meydana gelen solunum patlamasının patogenezde rol oynadığı bilinmektedir. ROT'lar oldukça önemli antimikrobiyal aktiviteye sahiptir ve fagositik vakuolde sindirim için elverişli bir ortam oluşturur.² Bakteriyel antijenlerin stimülasyonu sonucu nötrofillerden yüksek seviyelerde üretilir ve lipid peroksit oluşumuna katkıda bulunarak periodonsiyumda oksidatif hasarın artmasına neden olmaktadır.^{10, 67} Klinik ve hayvan çalışmaları, periodontal inflamasyonun periodontal lezyonda aşırı lipid peroksit üretimine neden olduğunu göstermiştir.^{68, 69}

Literatürde, periodontitisin sadece dişlerin prognozu ve ağız sağlığı üzerine olumsuz etkilere sahip (yani lokal etkili) bir hastalık olmadığına dair pek çok kanıt mevcuttur.^{3, 4} Periodontopatojenler ve onların virülans faktörleri, kan dolaşımı yoluyla direkt veya çeşitli inflamatuvar mediyatörlerin yoğun olarak salınımına ortam hazırlayıp indirekt olarak inflamasyona neden olmaktadır.³ Periodontitis ilişkili düşük dereceli sistemik kronik inflamatuvar durum; DM, obezite, romatoid artrit, psöriyazis, alzheimer ve hamilelik olmak üzere pek çok hastalık ve durum üzerine olumsuz etkilere sahiptir. Bununla birlikte kalp, böbrek gibi birçok organa da etkisi aşırıdır.^{3, 4} Düşük seviyeli

inflamasyon oksidatif stresi artırmaktadır ve kronik böbrek yetmezliği, proteinüri, üremi, glomerülonefrit ve tübülointerstisyel nefrit gibi çeşitli böbrek hastalıklarının patogeneğinde rol oynar.^{70, 71} Güncel çalışmalar periodontitis ilişkili oksidatif stres artışının böbrek doku ve fonksiyonlarını etkilediğini raporlamışlardır.^{8, 11, 71, 72}

2.2. Oksidan ve Antioksidan Sistem

ROT, oksijen metabolizmasının bir yan ürünü olarak oluşmaktadır. Biyolojik sistemlerde bulunan en önemli serbest oksijen radikalleri: süperoksit radikali (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali (OH^\cdot) ve tekli oksijen (O_2) dir. ROT'lar hücre sinyalizasyonunda önemli rol oynamakla birlikte yüksek seviyelere ulaştığında hücre hasarına neden olmaktadır.^{2, 73}

ROT oluşumunu ve vücutta meydana getirdiği hasarı önlemek için pek çok savunma mekanizması mevcuttur. Bu mekanizmalara aracılık eden moleküllere antioksidan adı verilmektedir. Antioksidanlar, hücrelerde bulunan DNA, karbonhidrat, protein ve lipit gibi maddelerin oksidasyonunu önleyerek ya da geciktirerek ROT'a karşı savunma mekanizmasını oluşturmaktadır.⁷⁴

Antioksidanlar; lokal oksijen konsantrasyonunu azaltarak, hidroksil radikallerini temizleyip lipid peroksidasyonunun başlamasını önleyerek, geçiş metal iyonlarını bağlayıp etkisizleştirerek, peroksitlerin alkol gibi non-radikal ürünlere dönüşümünde etkin rol oynayarak ve zincir reaksiyonlarına neden olan tüm radikallerle reaksiyona girip zinciri kırarak etkilerini gösterirler. Okside olan substratlara oranla çok daha az konsantrasyonlarda bile, substratın oksidasyonunu geciktirebilir veya inhibe edebilirler.^{75, 76}

ROT ve antioksidanlar arasındaki ilişki fizyolojik olarak denge halindedir. Bu hassas dengede, ROT salınımı ile aktivitesinde artış veya antioksidan savunma

mekanizmasında azalma olduğunda, oksidatif stres ortaya çıkmaktadır. Kısaca oksidatif stres, prooksidan-antioksidan dengede prooksidan lehine bir kayma olarak tanımlanabilir.^{2, 77} Oksidatif hasara duyarlı hücrel yapılar, nükleik asitlere, lipitlere ve proteinlere zarar vererek doku hasarına neden olmaktadır.² Oksidatif stres, kanser, ateroskleroz, kardiyovasküler hastalık, obezite, DM ve periodontitis gibi hastalıkların patogenezinde önemli rol oynamaktadır.^{2, 74, 78-81}

2.2.1. Total Antioksidan Kapasite, Total Oksidatif Durum ve Oksidatif Stres İndeksi

ROT konsantrasyonları birçok yöntemle serum veya plazmada birbirinden bağımsız ölçülebilmektedir. Oksidatif dengenin oksidanlar tarafına kaydığı durumlarda artış gösteren bu moleküller birbirinin üzerine eklenerek bulunabilir fakat birer birer ölçmekten ziyade total ölçümün daha pratik olacağı düşünülerek Erel tarafından tam otomatik kolorimetrik bir yöntem geliştirilmiştir.^{82, 83}

Serum, plazma ve vücut sıvılarında birçok antioksidan bulunmaktadır. Bu antioksidanların birbiriyle etkileşimleri sonucu antioksidan kapasitede artış meydana gelmektedir. Bu nedenle antioksidanların her birini ayrı ayrı ölçmektense total antioksidan kapasite (TAOK) ölçmek daha çok yarar sağlayacaktır.⁸⁴

Antioksidanların, oksidatif stres mekanizması üzerindeki genel etkilerini değerlendirmek için TAOK'un daha pratik ve güvenilir bir yöntem olduğu kabul edilmektedir. Düşük TAOK seviyeleri oksidatif strese ve oksidatif hasara duyarlılıktaki artışı yansıtmaktadır. Öte yandan, TAOK'un yaş, beslenme ve cinsiyetten etkilendiği bilinmektedir ve bu nedenle doğrudan oksidatif stresi ölçen total oksidatif durum (TOD) kadar etkili bir gösterge değildir. İnsan ve hayvan çalışmalarında^{19, 85-87} TOD / TAOK oranıyla ölçülen oksidatif stres indexi (OSİ)'nin oksidatif stres düzeyini değerlendirmenin

pratik ve güvenilir bir yöntem olduğu vurgulanmıştır. OSİ ile periodontal durum arasında güçlü bir korelasyon olduğu bildirilmiştir.^{85,86,88} Bu nedenle OSİ periodontal dokulardaki oksidatif hasarı değerlendirmek için yararlı ve pratik bir biyobelirteç olabilir.^{19,85}

2.2.2. Malondialdehit

Lipit peroksidasyonu, ROT üretimi fazla miktarda gerçekleştiği zaman kaçınılmaz bir durumdur. Oksijenin doymamış lipitler ile peroksidasyonu çeşitli oksidasyon ürünlerinin üretimine neden olmaktadır. Lipit peroksidasyonunun başlıca ürünü lipit hidroperoksittir (LOOH). Lipit hidroperoksitin aldehitlere ve diğer karbonil bileşenlere dönüşümüyle lipit peroksidasyonu sonlanır. Bu bileşimlerden biri malondialdehit (MDA)'dir ve lipit peroksitlerin seviyelerini tespit etmek için çalışmalarda sıklıkla MDA kullanılır. MDA, membran doymamış yağ asitlerinin serbest radikaller tarafından gerçekleştirilen lipit peroksidasyonunun son ürünüdür ve bir oksidatif hasar belirteçidir. Aldehit yapılı bileşimlerin yaşam süresi oldukça uzundur, bu nedenle lipit peroksidasyonunun etkileri kan, doku ve organlarda görülebilir.^{89,90} Hücrede bulunan DNA ve proteinlerle çapraz bağlar oluşturarak toksik ve mutajenik etkiler meydana getirirler.⁹¹

Lipid peroksidasyonu oksidatif stres ve serbest radikallere bağlı olarak hücre hasarında özellikle mikrozomlarda, mitokondri ve endoplazmik retikulumda patogenezin en önemli aktörüdür.^{92,93} Hücre ve dokuların zarar görmesi serbest radikal üretimine ve oksidatif strese neden olur. Oksidatif stresten doğrudan veya dolaylı olarak sorumlu olan tüm faktörler immün sisteme katılmaktadır.⁹⁴

2.2.3. Glutatyon

GSH nonprotein tiyol olup önemli bir antioksidandır.⁹⁵ Temel hücre içi antioksidan olarak kabul edilmektedir ve hücrel oksidatif hasarın inhibisyonunda

önemli bir role sahiptir.⁹⁶ Karaciğer başta olmak üzere tüm organlarda sentezlenir.⁹⁵ Total GSH'ın yaklaşık %90'ı sitozolde bulunurken geri kalanı ise mitokondri ve diğer organellerde bulunur.⁹⁷ GSH, hücrelerde serbest olarak veya proteinlere bağlı (%15) halde bulunabilir. Serbest glutatyon çoğunlukla redükte formda bulunur ve oksidatif stres varlığında okside forma dönüştürülür.⁹⁸

GSH döngüsünün devamlılığını sağlayan en önemli organlar karaciğer ve böbreklerdir.⁹⁹ Böbreklerde kullanılan glutatyonun büyük kısmı böbrek hücrelerinden tübüllere transfer edilerek karşılanırken geri kalan miktar plazmanın glomerüler filtrasyonu sonucu elde edilir.¹⁰⁰

Geri dönüşümsüz hücre hasarı meydana geldiğinde, hücredeki GSH içeriği değişir. Bu nedenle GSH konsantrasyonunun ölçülmesi, çeşitli patolojik durumların anlaşılması için önemli bir parametredir.⁹⁹

GSH, birçok reaksiyon için redükte kapasiteye sahiptir ve hidrojen peroksit, diğer peroksitler ve serbest radikallerin detoksifikasyonunda önemli rol oynar. Aynı amaçla glutatyonla bağımlı enzimler, serbest radikallerin yayılmasını engelleyeceği gibi ROT tarafından üretilen ürünlerin detoksifikasyonunu da sağlarlar. GSH bağımlı proteinlerin çoğu antioksidan ajanlar tarafından indüklenerek oksidatif stresin dengelenmesini sağlar.¹⁰¹

2.3. Böbrek

2.3.1. Böbreğin Anatomisi

Böbrekler retroperitonel bölgede kolumna vertebralisin iki yanında bulunur. Boyları yaklaşık 3 vertebra uzunluğunda olup genellikle 12. torakal ve 3. lumbal vertebralar arasında konumlanır. Sağ böbrek, karaciğerin komşuluğu sebebiyle sola göre biraz aşağıdadır. Uzunluğu 12-13 cm, eni 6-7 cm ve ön arka genişliği yaklaşık 3 cm'dir.

Sol böbrek yaklaşık 1 cm kadar daha uzun olup her birinin ortalama ağırlıkları 150 gr'dır. Böbrek dokusu en dıştan böbrek kapsülü ile çevrilidir. Bu zarın etrafı da retroperitoneal yağ dokusu ile sarılmış olup böbreği travmalara karşı korur. Böbreklerin medial bölgesinde hilus adı verilen bölgede renal arter, sinirler ve lenfatikler giriş yaparken renal ven ve üreter çıkmaktadır.¹⁰²

Böbreğin longitudinal kesiti incelendiğinde korteks ve medulla olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Medulla renalis böbreğin iç kısmında bulunur ve fonksiyonel olarak idrarın içeriğinde bir değişiklik yapmaz; sayıları genellikle 8-10 arasında değişen piramid adı verilen yapıları oluşturur. Bu piramidlerin taban kısımları böbreğin dış kısmına, papilla renalis denilen tepe kısımları ise minör kalikslere bakar. Korteks renalis, fonksiyonel olarak idrar oluşumunu sağlayan yapıları içerir. Kortikal cevherin piramidler arasında kalan kısmına kolumna renalis denir. Böbreğin fonksiyonel en küçük ünitesi, nefron adı verilen yapılardır. Nefron, sıvıların filtre edildiği renal korpüskül ve filtre edilen sıvıların sekresyon ve absorpsiyonu ile idrara dönüştürüp böbrek pelvisine taşınmasını sağlayan tübül sisteminden oluşur. Korpüskül, Bowman kapsülü içindeki glomerül yumağı olup nefronun başlangıç kısmını teşkil eder.^{103, 104} Her bir böbrekte yaklaşık olarak 1.000.000-1.250.000 nefron bulunmaktadır.¹⁰⁵

2.3.2. Böbreğin Fizyolojisi

Böbrekler filtrasyon, emilim ve salgılama gibi işlevleri olan multifonksiyonel organlardır. Vücuttaki fazla suyu ve artık ürünleri idrar şeklinde uzaklaştırıp, iç ortamdaki homeostazı sağlar. Böbrekler; kardiyovasküler, endokrin ve sinir sistemi ile koordineli çalışarak vücut sıvılarının içeriklerini, çok dar bir aralıkta tutmayı başarırlar. Böbreklerin hemostatik rolü sayesinde vücuttaki dokular nispeten sabit bir hemodinamik ortamda fonksiyon görürler. İstirahat halindeki sağlıklı bir insanda böbrekler, kardiyak çıkışın yaklaşık %20-25'ini almaktadır. Böbreğin temel süzme fonksiyonu nefronlar tarafından

sağlanır. Kanın, plazma kısmı glomerüllerde süzülerek ultrafiltratı meydana getirir. Oluşan ultrafiltratın kimyasal bileşimi plazmaya benzerdir ancak makromoleküller glomerul duvarından geçemediği için protein içermez.^{105, 106}

Glomerüler ultrafiltrat, nefronun tübül sisteminde ilerlerken bazı ihtiyaç duyulan moleküller ve suyun %99'dan fazlası özellikle proksimal tübüller tarafından geri emilime uğrarken bazı moleküller ise sekrete edilirler. Sonuçta ultrafiltratta reabsorbe edilmeyen maddeler ve su idrarı meydana getirir ve vücuttan uzaklaştırılır. Her iki böbrek dakikada (dk) 125 ml filtrat üretir. Bunun 124 ml'si emilir ve yalnız 1 ml'si idrar olarak salınır. Her gün ortalama 1500 ml idrar oluşur. Erişkin bir kişide vücutta dolaşan kanın tümü her 4-5 dk'da bir böbrekten geçer. Kanın hidrostatik basıncına cevap olarak glomerüler filtrat oluşur. Proksimal tübüller filtrattaki şeker ve aminoasitlerin tamamını, suyun ve sodyum klorürün %85'ini ve ayrıca kalsiyum ve fosfatı emer. Bütün bunlarla beraber proksimal tübüller kreatinin gibi maddeleri ve paraaminohippurik asit, iodopyracet (kontrast madde) ve penisilin gibi vücutta yabancı olan maddeleri idrara salgılar. Bu maddelerin sekresyon hızının belirlenmesi, böbrek işlevlerinin klinik açıdan değerlendirilmesinde yardımcı olur. Henle kulpu su tutma görevinde rol oynar. Distal tübüllerde ise iyon değişimi meydana gelir. Sodyumun emildiği, potasyumun da dışarı atıldığı bir iyon değişim bölgesi bulunur. Burası vücuttaki su ve tuzun kontrol edildiği bölgedir. Distal tübül aynı zamanda kandaki asit baz dengesinin korunmasında da önemli role sahiptir. Toplayıcı kanallar antidiüretik hormona (ADH) karşı duyarlıdır. Su alımı azaldığında ADH salgılanır ve toplayıcı kanalların epiteli suya geçirgen hale gelerek idrar konsantrasyonu artırılır.^{105, 106}

2.3.3. Böbrek Fonksiyonları

Böbreğin en bilinen fonksiyonu idrar üretimidir; ancak böbreğin başka görevleri de vardır. Metabolik atıkların ve yabancı maddelerin uzaklaştırılması, sıvı ve elektrolit

dengesinin sağlanması, kan basıncının düzenlenmesi, asit-baz arasındaki dengenin korunması, eritropoetin (EPO) oluşumu, aktif D vitamini sentezi, hormonların salgılanması ve itrahi böbreğin fonsiyonlarından bazılarıdır.^{106, 107}

Su ve elektrolit dengesinin sağlanması: Böbrekler, toplam vücut su miktarında değişiklik oluşturmada su dengesini ayarlar. Değişken oranlarda mineralleri atabilir, alımı ve atılımı dengeleyebilirler. Proksimal tübüllerde su, küçük molekül ağırlıklı proteinler, glikoz ve bazı iyonlar geri emilir. Geçiş su ile birlikte olduğundan ortam izotoniktir. Henle kulpu primer idrarın sekonder idrara dönüşmesinde kilit rol oynar. Henle kulpunun inen ince kolunun suya geçirgen olması, sodyumu orta derecede geçirmesi, çıkan kalın kolunun ise suya geçirgen değilken diğer solütlere geçirgen olması, ultrafiltrata göre çok daha hipertonic bir ortam oluşturulmasını sağlar. Bu ortam sayesinde difüzyon ve aktif taşıma ile elektrolit transferi kolaylaştırılmış olur. Henle kulpunun çıkan kalın kolundan kortekse gidildikçe daha hipotonik bir ortam oluşur.¹⁰⁶ Tübüllerden geri emilen su ve solütlere, kapiller ve vasa rekta aracılığıyla tekrar dolaşıma katılır¹⁰⁸. Renin, aldosteron, anjiyotensin ve vazopressin gibi hormon ve mediyatörlerle bu sistem kontrol edilir. Böylelikle asit baz dengesi ve sıvı elektrolit dengesi düzenlenmiş olur.¹⁰⁹

Aktif D vitamini sentezinin düzenlenmesi: Biyolojik olarak aktif olmayan D vitamini önce karaciğerde hidroksillenir ve 25-hidroksikolekalsiferole dönüşür. Ardından böbrekte 1 α hidroksilaz enzimi aracılığı ile 1,25-dihidroksikolekalsiferole yani aktif D vitaminine dönüşür. Kronik böbrek hastalarında 1 α hidroksilaz aktivitesinin azalmasından dolayı D vitamini eksikliği yaygın şekilde görülmektedir.¹¹⁰ Bu da bağırsaktan kalsiyum emiliminin azalmasına, kemik mineralizasyonunun bozulmasına ve hipokalsemiye yol açar.¹⁰⁷ Ayrıca D vitamini kalsiyum geri emiliminde %1 rol oynayan distal tübüllerin uyarılmasında da önemli rol oynamaktadır.¹¹⁰

EPO sentezi: EPO böbrek korteksindeki peritübüler fibroblastlarda üretilen glikoprotein yapıda bir sitokindir. Yetişkin bireylerde EPO üretimi ağırlıklı olarak böbreklerde olsa da çok az bir kısmı beyin, karaciğer, akciğer, testis ve dalak gibi organlarda üretilir.¹¹¹ Kemik iliğindeki eritroid öncü hücrelerini uyararak çoğalmalarını ve olgunlaşmalarını sağlar. Böbrek hasarı durumunda EPO yapımı bozulur ve buna bağlı olarak anemi gelişir.¹⁰⁷

Kan basıncına etkisi: Arter basıncının ortalama değeri kardiyak çıkışa ve total periferik dirence bağlıdır. Kardiyak çıkıştaki atım hacmi venöz dönüşten etkilenir. Kronik böbrek hastalığında tübüler işlev azaldıkça böbrekler vücutta su tutmaya başlar. Buna bağlı olarak venöz dönüş artar ve ortalama arter basıncı yükselir. Bu yüzden kronik böbrek hastalıkları genellikle hipertansiyon ile birlikte dir.¹⁰⁷

Renin anjiyotensin sistem (RAS): RAS, kan basıncı ve sıvı dengesi için ana kontrol sistemlerinden biridir. Dolaşım homeostazında yer alır ve vücut sıvı hacimlerini korur.¹¹² Renin, özelleşmiş hücreler olan jukstaglomerüler hücrelerden salınan proteolitik bir enzimdir. Sağlıklı kişilerde renin salınımını belirleyen esas unsur sodyum alımı yani tuzlu diyetle beslenmedir. Fazla tuz tüketiminde renin salınımı azalır. Renin, karaciğer tarafından üretilen anjiyotensinojeni (Agt) anjiyotensin I'e dönüştürür. Anjiyotensin I de daha sonra anjiyotensin dönüştürücü enzim (ADE) tarafından katalizlenerek anjiyotensin II'ye dönüştürülür.¹¹³ Anjiyotensin II, bu sistem tarafından üretilen biyolojik olarak aktif temel hormondur.¹¹² Birçok önemli işlevi vardır: vasküler yatakta vazokonstriksiyona ve kan basıncının artışına sebep olur. Vazokonstriksiyon etkisiyle intraglomerüler basınç artışına yol açarak glomerüler filtrasyon hızının (GFH) artmasını sağlar. Hipertansiyon durumunda ADE'yi inhibe ederek kan basıncının azalmasını sağlamaktadır. Sodyum geri emilimi üzerine direkt olarak etkisi vardır.^{113, 114} Anjiyotensin II'nin vücuda zararlı olan birçok etkisi de mevcuttur: İnterselüler ve vasküler adezyon molekülleri (ICAM ve

VCAM), reaktif oksijen radikalleri, nükleer faktor kappa beta (NF-k β) ve superoksit gibi moleküllere farklı mekanizmalarla etki etmektedir.¹¹⁴

Sistemik RAS'ın yanısıra lokal olarak RAS aktivasyonu da gerçekleşmektedir. En bilinen örneklerinden biri de böbrek proksimal tübülünde gerçekleşmesidir.¹¹⁴ Lokal olarak sentez edilen anjiyotensin II, sistemik RAS aktivasyonuna gerek kalmadan fonksiyon görebilmektedir.¹¹³ Ayrıca bu bölgedeki anjiyotensin II konsantrasyonu, sistemik dolaşımdakinden yaklaşık 1000 kat daha yüksektir.¹¹⁴ İdrardaki Agt'nin, esas olarak proksimal tübül epiteliyle sentezlenen Agt proteininin salgılanmasını yansıttığı ve bu nedenle üriner Agt'nin intrarenal RAS'ın aktivasyonunu izlemek için yararlı bir biyobelirteç olabileceği öne sürülmüştür.¹¹²

RAS; böbrek, kalp ve vasküler fizyolojinin düzenlenmesinde çok önemli bir role sahiptir. Hipertansiyon, kalp yetmezliği ve böbrek hastalıklarının dahil olduğu patolojilerin çoğunda artmış RAS aktivasyonu mevcuttur.¹¹⁴ Anjiyotensin II'nin farmakolojik olarak sentezi veya inhibitörlerinin, kardiyovasküler terapötiklerde son derece yararlı olduğu bilinmekle birlikte, ADE inhibitörleri hipertansiyon, konjestif kalp yetmezliği ve böbrek hastalıklarının tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır.¹¹²

2.3.4. Böbrek Fonksiyon Parametreleri ve Önemi

2.3.4.1. Kreatinin, Üre ve Sistatin C

Böbrek hasarının tespit edilebilmesinde böbrek fonksiyonu ile ilişkilendirilmiş serum üre, kreatinin ve sistatin C seviyelerinin değerlendirilmesi gibi biyokimyasal analizler önem taşımaktadır.¹¹³

Kreatinin: Diyetle alınan hayvansal proteinlerden ve iskelet kasındaki fosfokreatin metabolizması sonucu oluşturulur. Bu nedenle vücuttaki üretimi kas kitlesi ile orantılıdır. Buna bağlı olarak da yaş, cinsiyet ve vücut kitlesinden etkilenir.¹¹⁵

Glomerüllerden serbestçe filtre edilir ve proksimal tübül tarafından da aktif olarak salgılanır.¹¹⁶ Fakat böbreklerden geri Emilimi, yapımı veya metabolizması söz konusu değildir. Kısmen sabit plazma konsantrasyonu vardır. Kreatinin atılımı yaklaşık olarak filtre edilen miktara eşittir ve yapım hızı da sabittir. GFH'nin düşük olduğu durumda kreatinin filtrasyonu ve atılımı da azalacaktır. Böylelikle yeni sentezlenen kreatinin, filtre edilen ile yapım arasında yeni denge kurulana kadar plazmada birikmeye devam edecektir.¹¹³ Sağlıklı bir yetişkinde kreatininin tübüler sekresyonu %10-15'tir ancak ilerlemiş böbrek yetmezliğinde bu oran %40'lara kadar ulaşabilir.¹⁰⁶ Serum kreatinin konsantrasyonu, yaygın olarak GFH'nin bir ölçüsü olarak yorumlanır ve klinik uygulamada bir böbrek fonksiyon biyobelirteci olarak değerlendirilir. Bununla birlikte, kreatininin glomerüler filtrasyonu, serumdaki konsantrasyonunu belirleyen değişkenlerden yalnızca biridir. Çok sayıda sınırlamaya rağmen, serum kreatinin yararlı bir biyobelirteç olmaya devam etmektedir, ancak böbrek fonksiyonunu belirleyen daha doğru ölçümlere sıklıkla ihtiyaç vardır.¹¹⁷

Üre: Protein sentezinde kullanılmayan aminoasitlerin karaciğerde metabolize edilmesi sonucunda ortaya çıkmaktadır. Aminoasitlerin deamine olmasıyla amonyak oluşmakta ve bir takım enzimatik reaksiyon sonucu üreye çevrilmektedir.¹¹³ Protein katabolizması sürecini yansıttığından; aşırı beslenme, yüksek protein içerikli diyet sonrasında ve gastrointestinal kanamalarda kan üre düzeyi artar. Tam tersine malnütrisyon, enfeksiyon ve malignite gibi katabolik durum veya karaciğer hastalıklarında ise azalır. Dolayısıyla serum düzeyi sabit değildir. Glomerüllerden serbestçe filtre edilir. Filtre edilen ürenin yaklaşık %50'si, çoğu proksimal tübül olmak üzere, su ve sodyumu takiben pasif difüzyonla geri emilmektedir.¹¹³ Temel atılımı böbrekler aracılığıyla yapıldığından, serum düzeyi GFH için ana biyobelirteçlerden biridir. Fakat kullanımını kısıtlayan iki ana faktör vardır bunlar; üre yapım hızının ve

tübüler absorpsiyon oranının GFH'den bağımsız olmasıdır. Proksimal tübülde sodyum ve su absorpsiyonu arttıran her türlü uyarı kan üre düzeyini arttıracaktır. Bu durum GFH ve serum kreatininde pek değişiklik olmadan üre konsantrasyonunun arttığı, dolayısıyla üre/kreatinin oranının yükselmesi ile tanısal olarak desteklenen böbrek perfüzyon defektinin göstergesidir.¹¹⁵ Pratikte serum kreatinin düzeyi, böbrek fonksiyonlarını değerlendirmek için üreye göre daha değerlidir.¹⁰⁶ Fakat ileri böbrek hastalığı vakalarında kreatininin artan tübüler sekresyonuna bağlı yanılısama ile ürenin tübüler absorpsiyonuna bağlı yanılısama oransal olarak benzerdir. Bu iki parametrenin klirensinin ortalaması, bu hastalarda daha gerçekçi bir GFH'yi ortaya koyabilir.¹¹⁵

Sistatin C: Nonglikolize, 122 amino asit içeren, düşük molekül ağırlıklı bir protein olup, sistein proteinaz inhibitörlerinden sistatin süper ailesinin bir üyesidir. Tüm çekirdekli hücrelerden sabit bir oranda sentezlenmekte, böbrek tübülleri tarafından reabsorbe ve katabolize edilmekte, ancak sekrete edilmemektedir.^{118, 119} Serum sistatin C'nin serum kreatinine göre doğruluk payı daha çok olan böbrek fonksiyon belirteci olduğu düşünülmektedir. Özellikle kadınlar, yaşlılar, yetersiz beslenen hastalar ve kanserli hastalar dahil olmak üzere düşük kas kütlesi olan kişilerde, sistatin C kreatinine göre daha güçlü ve alternatif bir filtrasyon biyobelirteci olarak dikkat çekmiştir.¹¹⁹ Herhangi bir hastalığı olmayan genç erişkinlerde serum düzeyleri 0.85-1.12 mg/l aralığında bulunmuştur. 50 yaşına kadar genellikle sabit olmakla birlikte sonrasında yaşla artar. Glomerüllerden serbestçe filtre edilir. Filtre edilen sistatin C'nin %99'u proksimal tübülde katabolize edilir. Dolayısıyla idrarda çok az miktarda bozulmamış sistatin C bulunur. Birçok çalışmada özellikle böbrek fonksiyonları henüz hafif derecede bozulduğunda, serum sistatin C düzeyinin serum kreatinine göre daha erken yükseldiği gösterilmiştir.¹¹⁵

2.3.4.2. Apoptozis ve Kaspazlar

Apoptozis ilk kez 1972 yılında Kerr ve ark.¹²⁰ tarafından tanımlanmıştır. Programlı hücre ölümü olarak bilinen apoptozis, immun sistem ve vücut homeostazı için vazgeçilmezdir. Hücrenin yaşam boyunca yapım-yıkım dengesinin sürdürülmesini sağlamaktadır.^{120, 121} Primer veya sekonder olarak gelişebilir. Hücrenin kendi genlerinin aktivasyonu veya gelen sinyallerle başlatılmaktadır. Apoptozun işleyişinde kaspazlar, Bcl-2 ailesi proteinleri ve Apaf-1 (apoptotik proteaz aktive edici faktör-1) proteinleri görev yapar. Bunların biyokimyasal aktivasyonu ile mitokondriyal hasar, çekirdek zarında yer yer erime, kromatin yoğunlaşması, DNA fragmantasyonu, ve apoptotik cisimlerin şekillenmesi gibi morfolojik değişiklikler ortaya çıkar.¹²⁰

Kaspazlar (sistein aspartat spesifik proteaz) apoptotik süreçte rol oynayan önemli bir protein ailesidir. İnsanlarda 11 kaspaz enzimi mevcuttur ve genel olarak inaktif proenzimler halinde bulunurlar. İnaktif olan prokaspazlar hücrede sentez edilerek depolanır. Apoptozisin indüklenmesi genellikle kaspaz 2, 8 veya 10'un aktivasyonu ile başlar ve bunlar, diğer kaspazları aktive eder. Bu süreç kaspaz 3, 6 ve 7 gibi efektör kaspazların aktivasyonu ile sonuçlanır. Hücre apoptotik cisimcikler oluşturacak şekilde kendini parçalar. Apoptotik cisimcikler fagositik hücreler tarafından sindirilir.^{106, 122}

Sağlıklı yaşam, hücresel yapım (mitoz) ve yıkım (apoptoz) arasındaki hemostatik dengeye bağlıdır. Bu dengenin apoptoz yönüne kayması hücre kaybı oluşturarak iskemik hasar veya dejeneratif hastalıklar gibi sonuçlar doğurabilirken, dengenin hücre yapımı yönüne kayması ise otoimmün veya kanser gibi hastalıkları ortaya çıkarmaktadır.¹²³

Apoptoz renal iskemi reperfüzyon hasarı sırasında hücre ölümü için birincil mekanizmadır. Bu nedenle kaspaz-3 aktivitesi iskemi-reperfüzyon çalışmalarında çok araştırılmıştır.^{124, 125}

2.3.4.3. Katepsinler

Lizozomlar, farklı makromoleküllerin parçalanmasından ve geri dönüşümünden sorumlu olan hücre organelleridir ve hücrenin parçalanmadan sorumlu ana kompartmanını oluştururlar. İki protein sınıfı lizozomal aktiviteye aracılık eder: integral lizozomal membran proteinleri ve çözünür lizozomal hidrolazlar. Hidrolazlar arasında katepsinler (Kt), proteinlerin ve hormonların işlenmesinden, hücre döngüsünün, otofajinin, hücre ölümünün ve bağışıklık yanıtının düzenlenmesine kadar çok sayıda hücrenel süreçte yer alır. Lokalizasyon ve ekspresyon seviyelerindeki farklılıklar, farklı organlarda ve dokularda spesifik hücrenel fonksiyonlar olduğunu düşündürmektedir. Özellikle, hücre tipi lokalizasyonuna bağlı olarak, Kt B, D, L ve S, böbrek hastalığına neden olabilecek sinyal yollarını aktive ederek böbrekte farklı fizyopatolojik süreçleri düzenler. Kt'in değişen ekspresyonu ve/veya aktivitesi, çeşitli hastalıklar ile ilişkilendirilmiştir.¹²⁶

Serum kreatinin ile GFH ve proteinüri varlığı gibi böbrek fonksiyonlarını değerlendirmek; kullanılan diğer geleneksel klinik parametreler genellikle hastalığın erken evrelerinin kaçırılmasına ve tedavinin geciktirilmesine neden olmaktadır. Akut böbrek hasarı (ABH) ve KBH olmak üzere iki ana böbrek hastalığı, artan morbidite ve mortalite ile ilişkilidir. Bu nedenle, hastalığın ilerlemesini tahmin edebilen, yeni tedavi protokolleri sağlayabilen, hücrenel ve moleküler araçları tanımlayabilecek daha doğru ve hassas hücre hasarı biyobelirteçleri bulmaya ihtiyaç vardır. Lizozomal Kt, son yıllarda böbrek hastalıklarında önemli rol oynadığı ortaya çıkmış ve bu nedenle erken tanı için tespit edilmeleri önerilmektedir. Dahası, böbrek hastalıklarının ilerlemesini yavaşlatmak için umut verici bir tedavi stratejisi gibi görünmektedir.¹²⁶

2.4. Periodontitis ve Böbrek

Kronik periodontitis, periodonsiyumu etkileyen oldukça yaygın görülen inflamatuvar bir hastalıktır. Çiğneme hareketleri, diş fırçalama veya diş tedavilerinden kaynaklanan bakteriyemi yaygın olarak görülmektedir. Kan dolaşımına giren periodontal bakteriler bir immün yanıtı neden olur. Ayrıca periodontitis, sistemik inflamasyona katkıda bulunan proinflamatuvar belirteçlerle de ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu yollar ile kronik periodontitis, diğer sistemik durumlarla bağlantılı olabilir. Şiddetli periodontitis dünya nüfusunun %10-15'i gibi büyük bir kısmını etkilemektedir. Bu kadar yaygın bir hastalık olmasına rağmen aslında tedavisi son derece kolaydır. Yan etkilerini ortadan kaldırmak için diğer sistemik durumlarla potansiyel ilişkilerinin açıklığa kavuşturulması oldukça önemlidir.¹²

Akut veya kronik inflamatuvar durumlar böbreklerdeki immüninflamatuvar cevapları da stimüle edebilmektedir.⁵ Periodontitis böbrek dokularını 2 şekilde etkileyebilir; 1) genel sistemik inflamatuvar yüke katkıda bulunur ve bu da böbrek fonksiyon düşüşünü tetikleyebilir; 2) periodontal bakteriler ve ürünleri kan dolaşımına geçip böbrek epiteline zarar verebilir.^{12, 127}

KBH tanısı konulduğu andan itibaren böbrek fonksiyonlarının korunması ve fonksiyon kaybının önlenmesi oldukça önemlidir. Böbrek fonksiyonlarının daha fazla bozulmasına yol açan belli başlı risk faktörleri vardır. Bunlar; yüksek kan basıncı, proteinüri derecesi ve sigara tüketimidir. Son yıllarda bu listeye eklenen yeni risk faktörleri lipidler, homosistein, oksidatif stres ve inflamasyondur. Bu faktörlerin hem böbrek hasarını ortaya çıkarmada hem de hasarın ilerlemesinde rolleri olduğu düşünülmektedir.¹²⁸

Literatüre bakıldığında, periodontitisin böbrek yapısı ve fonksiyonları üzerine muhtemel etkileri hususunun son yıllarda yoğun olarak irdelendiği görülmektedir.⁶⁻¹⁰ Eldeki bulguların büyük çoğunluğu periodontal kaynaklı inflamatuvar stresin böbrek fonksiyonlarında çeşitli düzeylerde bozulmalara neden olarak KBH riskini artırdığını göstermektedir.^{11, 129} Chambrone ve ark.¹²⁹ periodontisli bireylerin periodontal sağlıklı olanlara kıyasla KBH açısından 1.65 kat daha fazla riske sahip olduklarını rapor etmişlerdir.

Destekler şekilde, Grubbs ve ark.¹³⁰ ise şiddetli periodontitisin, 5 yıllık takip süresi boyunca hafif/orta şiddetteki periodontitise kıyasla KBH ile belirgin bir ilişkisi (3.8 kat artış) olduğunu tespit etmişlerdir. Bunun yanı sıra yaş, cinsiyet, diabet, hipertansiyon, sigara ve gelir durumu gibi diğer faktörlerin periodontitis ilişkili renal hasara katkı sağlayabileceğini de bildirmişlerdir.

İnflamasyon, ateroskleroz ve KBH arasındaki ilişkiyi destekleyen kanıtlar da vardır. Düşük seviyeli inflamasyon, ROT üretimi ve oksidatif stresi artırır. Önemli bir sistemik inflamasyon belirteci olan C reaktif proteinin (CRP), hem periodontal hem de KBH hastalarında yüksek olduğu, bu bağlamda kronik periodontal inflamasyonun KBH ile ilişkili sistemik inflamatuvar yüke katkıda bulunabileceği gösterilmiştir⁷¹. Ayrıca KBH patogenezinde anahtar bir mekanizma olarak kabul edilen endotelial disfonksiyonun periodontitis ilişkili sistemik proinflamatuvar durum (IL-1 β , IL-6, IL-8 ve TNF- α düzeylerindeki artış) tarafından tetiklendiği de gösterilmiştir.^{11, 72}

Periodontal tedaviden sonra endotelial fonksiyonda bir iyileşme ve GFH'nin artması, KBH prognozunda bir iyileşme olduğunu ve şiddetli periodontitis görülen hastalarda böbrek fonksiyonunun stabilize edilmesine katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir.¹³¹

Franca ve ark.⁸ deneysel periodontitisli ratlarda renal túbüllerin fırçamsı kenarlarında tespit ettikleri yapısal değişiklerin oksidatif stres artışı ile ilişkili olabileceğini vurgulamışlardır. Buna karşın, periodontitisin böbrek fonksiyonları üzerine etkisinin ise çok sınırlı olduğu tespit etmişlerdir. Destekler şekilde, Wangerin ve ark.¹² böbrek fonksiyonel kapasitesini GFH ile takip ettikleri 11 yıllık kapsamlı bir takip çalışması sonucunda periodontal durumun böbrek üzerine sınırlı bir etkiye sahip olduğunu ortaya koymuşlardır. Takip sırasında artan periodontitis şiddetine paralel olarak inflamatuvar biyobelirteçlerin artmadığı gözlemlenmiş olup sadece küçük ve heterojen değişiklikler gösterilmiştir.

Takeuchi ve ark.¹³² hemodiyaliz hastalarının periodontal dokularında periodontopatojenlerden Tannarella forsythia ve Treponema denticolanın sağlıklı kontrol gruplarına göre daha sık tespit edildiğini bildirmişlerdir. Destekler şekilde Castillo ve ark.¹³³ Tannarella forsythia, Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia ve Prevotella nigrescens konsantrasyonlarının sağlıklı kontrollere kıyasla hemodiyaliz hastalarında arttığını tespit etmişlerdir. Bu mikrobiyal yük artışının direkt olarak periodontal hastalığa bağlı olmadığını, böbrek hastalıklarının bakteriyel bileşimi etkileyebileceğini göstermişlerdir.

Davidovich ve ark.¹³⁴ ağız sağlığı durumuna göre beş grubu karşılaştırdığı bir çalışmada böbrek yetmezliği gruplarında sağlıklı kontrollere göre gingival inflamasyonun, periodontal sondlama derinliklerinin, ataçman kaybının ve pulpa obliterasyonunun arttığını ve daha az çürük varlığını tespit etmişlerdir.

Japonya'da yaşlı bireyler üzerinde yapılan bir çalışmada klinik ataçman seviyesinin ≥ 6 mm olduğu alan yüzdesi ile böbrek fonksiyonu ve kemik metabolizması belirteçleri arasında anlamlı bir ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma, yaşla birlikte

ortaya çıkan kronik böbrek yetmezliği insidansının yaşlı bireylerde şiddetli periodontal hastalık olasılığını artırabileceğini düşündürmektedir.¹³⁵

Borawski ve ark.¹³⁶ diyaliz ve KBH hastalarını sistemik olarak sağlıklı kişilerle karşılaştırmış ve böbrek yetmezliği gruplarında, sistemik olarak sağlıklı olanlara göre daha şiddetli periodontitis varlığını rapor etmişlerdir.

Periodontitis ve KBH arasındaki ilişkiyi destekleyen kanıtlar artmasına rağmen, tüm çalışmalar pozitif bir ilişki göstermemektedir. Örneğin, Castillo ve ark.¹³⁷ son dönem böbrek yetmezliği ile şiddetli periodontitis arasında bir ilişki bulamamıştır.

Hayvan çalışmalarından elde edilen bulgular genel olarak değerlendirildiğinde periodontitisin böbreklerde yapısal değişikliklere neden olduğu^{8, 138} fakat fonksiyonel durumun sınırlı düzeyde etkilendiği⁸⁻¹⁰ tespit edildi.

Periodontitis hem lokal hem de sistemik inflamasyonu ve bunlarla ilişkili biyobelirteçleri arttırmaktadır. Bu durum, glomerüler endoteli etkileyebilir ve bu da böbrek yetmezliğine sebep olabilir. Bununla birlikte periodontitisin etkin tedavisinin böbrek fonksiyonlarını olumlu yönde etkilediğine yönelik çalışmalar da literatürde mevcuttur.^{131, 139-142} Tüm bu kanıtlar, inflamatuvar ve oksidatif durumlardan yapısal ve fonksiyonel olarak çeşitli düzeylerde etkilenebilen böbreklerin korunmasında immünmodulator ve antioksidan özelliklere sahip ajanların faydalar sağlayabileceğini düşündürmektedir.¹⁴³⁻¹⁴⁵

2.5. Melatonin

2.5.1. Melatonin Hormonu ve Özellikleri

Melatonin hormonu, pineal bez yapısında bulunan pinealositler tarafından sentezlenir. Bu hücreler tarafından melatonin sentezlenebilmesi için esansiyel bir aminoasit olan triptofana gereksinim vardır. Kan dolaşımından pinealosit içine alınan

triptofan önce 5- hidroksitriptofan'a hidroksile olup daha sonra serotonine dekarboksile olur. Oluşan serotonin ise enzimler aracılığıyla melatonine dönüştürülür¹⁴⁶. Pineal bez haricinde lakrimal bez, retina, eritrosit, trombosit ve gastrointestinal sistem hücreleri tarafından da düşük konsantrasyonlarda melatoninin sentezlendiği gösterilmiştir. Melatonin hormonunun depolanabilirliği olmadığından serumdaki konsantrasyonu pineal bezin aktivitesiyle ilişkilidir.¹⁴⁷

Melatoninin sentezini en çok etkileyen faktör karanlık ve aydınlık durumdur.¹⁴⁸ Buna bağlı olarak melatonin seviyesi akşam 20.00-23.00 saatlerinde artmaya başlar, saat 01.00-05.00 arasında en üst seviyeye ulaşır ve gündüz düşer. Sağlıklı kişilerde melatoninin plazma konsantrasyonu gündüz saatlerinde yaklaşık 0-20 pg/ml düzeylerinde seyrederken, gece saatlerinde bu değer 20-200 pg/ml düzeylerine ulaşır. Bir günde yaklaşık 30 mg civarında melatonin sentezlenir.¹⁴⁹

Cinsiyetin melatonin salınımı üzerine etkisi olmadığı düşünülürken,¹⁵⁰ serum melatonin düzeyi yaşa göre değişkenlik göstermektedir.¹⁴⁸ Yeni doğanda sekresyon çok düşüktür ve doğumdan kısa bir süre sonra artarak 1-3 yaş arası pik yapar ve sonra tekrar düşer. Puberte döneminde sekresyonu sirkadyen hale gelir. Yirmili yaşlardan sonra melatoninin sentez ve salgılanma hızı azalmaya başlar ve 60'lı yaşlarda en düşük seviyelere ulaşır.¹⁴⁹

Melatonin hem suda hem yağda çözünebilen; fakat lipofilik özelliği daha baskın olan bir hormondur. Bu sayede vücuttaki tüm doku ve sıvılara kolayca ulaşabilmektedir.¹⁵¹ Etkileri sadece hücre membrana yönelik değildir. Kısmen hidrofilik olması intrasellüler etkilerinin oluşmasına katkıda bulunur.¹⁴⁹ Böylece nükleusta ve mitokondride yüksek konsantrasyonlarda melatonin görülmektedir.¹⁵²

Pineal bezde kan beyin bariyeri bulunmadığı için salgılanan melatonin direkt olarak sistemik dolaşıma geçer. Belirli antikorların yardımı ile melatonin; beyin, retina, lens, deri, mide, bağırsak, karaciğer, böbrek, tiroid, pankreas, timüs, dalak, bağışıklık sistemi hücreleri, karotid cisim, solunum yolu epiteli, üreme yolu ve endotel hücreleri dahil olmak üzere birçok dokuda tespit edilmiştir. Melatonin, beyin omurilik sıvısı, tükürük, safra, eklem sıvısı, amniyotik sıvı ve anne sütü de dahil olmak üzere vücuttaki tüm biyolojik sıvılara kolayca geçebilmektedir. Bu sıvıların birçoğunda bulunan melatonin konsantrasyonu, kandaki konsantrasyondan daha yüksektir. Hücresel düzeyde melatoninin sürekli kullanılabilir olması, hücre homeostazının düzenlenmesi için oldukça önemlidir.¹⁵³

Melatoninin yarı ömrü 3-45 dk arasında olup %60-70 oranında kanda albümine bağlı olarak bulunur. Melatonin primer olarak karaciğerde metabolize edilir. Yaklaşık %92-97 oranında ilk geçiş metabolizmasına uğrar. Melatoninin karaciğerdeki en önemli metaboliti 6-hidroksimelatoninidir. Bu bileşen sülfat ve glukronik asitle konjuge edilip idrarla dışarı atılır. %1 den daha az bir kısmı ise değişmeden idrarla atılır. İdrardaki başlıca metaboliti 6-sülfatoksimelatoninidir ve bu metabolitin idrardaki miktarı serum melatonin konsantrasyonu hakkında bilgi verir.¹⁵⁴⁻¹⁵⁷

2.5.2. Melatonin Hormonunun Etkileri

Literatürde melatoninin birçok fizyolojik fonksiyon üzerine etkisi olduğu bilinmektedir. Bunlardan bazıları şöyledir;

Uyku uyanıklık döngüsüne etkisi: Uykunun düzenlenmesindeki esas olay ışığa veya karanlığa maruz kalmadır. Gelen ışık gözün retinasındaki nöronlar aracılığı ile alınıp oksipital bölgedeki merkezi sinir sistemi hücrelerine iletilir ve bir takım otonom ve endokrin olaylara yol açar. Bu olayların hepsi vücudun biyolojik saatini oluşturur. Gün

ışığı kaybolduğunda pineal bez uyarılır ve melatonin salınımı başlar. Melatoninin pineal bezden salgılanması için uyumak şart değildir. Gece karanlığı olduğu zaman da melatonin salınımının gerçekleştiği bilinmektedir. Melatonin, uykunun gelmesini sağlayan ve belirli bir zamanda da uyanmayı sağlayan düzenleyici bir saat gibidir.^{158, 159} Melatoninin toplam uyku süresinden çok uykunun başlangıcı ve kaliteyle ilgili olduğu bulunmuştur. Birçok araştırmada melatonin tedavisinin uykuya dalmada yardımcı olduğu ve uyku kalitesini arttırdığı görülmektedir.¹⁶⁰

Termoregülasyon etkisi: Vücut ısısının düzenlenmesi hipotalamusda gerçekleşir ve yapılan araştırmalarda burada melatonin reseptörlerinin bulunduğu bilinmektedir. Fiziksel aktivite sırasında kandaki melatonin seviyesi değişir ve vücudun ısısını dengede tutar.^{158, 159} Ayrıca melatonin, geceleri vücut sıcaklığının düşmesine katkı sağlar ve kişinin uyku isteğini artırır.¹⁶¹

Endokrin etkisi: Pineal bez, organizmadaki endokrinolojik aktiviteyi hipofiz, tiroid, adrenal bez ve gonadlar üzerinden düzenlemektedir.¹⁶² Melatonin salınımının, gonadal hormonları etkilediği bilinmektedir.^{163, 164} Hipotalamustaki gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) üretimini ve lüteinleştirici hormon salgılanmasını inhibe etmektedir. Ayrıca endorfin gibi GnRH salgılanmasını azaltan opioid maddelerin sekresyonunu da artırarak dolaylı olarak etkilemektedir. Melatoninin gonad hormonlarına olan etkilerinden başka, prolaktin salınımını artırma, melanosit uyarıcı hormon salınımının inhibisyonu, vazopressinin günlük salınımını artırma ve erkeklerde growth hormon sekresyonunu artırma gibi etkileri de vardır. Melatoninin ayrıca böbrek üstü bezi ve tiroid bezi gibi diğer endokrin organlar üzerinde de etkisi mevcuttur. Tiroid bezi fonksiyonları üzerinde genel olarak inhibitör etki göstermektedir. Böbrek üstü bezi fonksiyonlarında da inhibitör etki göstererek glukokortikoid ve mineralokortikoid sekresyonunu azaltır.¹⁴⁶

Kardiyak etkisi: Melatoninin kardiyovasküler sisteme olan etkisi literatürde gösterilmiştir.¹⁶⁵⁻¹⁶⁷ Melatonin MT1 reseptörleri ile vazokonstriksiyona aracılık ederken, MT2 reseptörleri ile vazodilatasyona aracılık etmektedir. Miyokard infarktüs ve ani ölüm riski bulunan koroner kalp hastalarında melatonin düzeyleri düşüktür.¹⁶⁷ Benzer şekilde düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) kolesterol düzeyleri yüksek olanlar ve hipertansif hastalarda da melatonin düzeyi düşük bulunmuştur.^{167, 168} Söz konusu hormonun verilmesi kan basıncını normal aralığa düşürmekte ve kolesterol seviyesini de azaltarak aterosklerozis riskini azaltmaktadır. Böylece kardiyovasküler sistem üzerinde koruyucu etkisi olduğu düşünülmektedir.¹⁶⁷

Antioksidan etkisi: Melatonin direkt ve indirekt yollarla serbest radikallere etki edebilen çok güçlü bir antioksidandır.¹⁶⁹ Glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz gibi antioksidanların uyarılmasını sağlar.¹⁷⁰ Serbest radikallerle etkileşimi sırasında elektron kaybederek prooksidan etkilere sahip moleküler yapılara dönüşmemektedir. Bu da diğer antioksidanlara karşı daha avantajlı olmasını sağlar.^{19, 171} Lipofilik olduğundan dolayı hücre organellerine kolaylıkla geçebilir.¹⁵² Bol miktarda serbest radikallerin üretildiği mitokondride melatoninin hem kolay alımı hem de organelde sentezi sebebiyle yüksek konsantrasyonlarda tespit edilmiştir. Bu sayede mitokondrinin iç membranı ROT toksisitesinden korunmaktadır.¹⁷⁰ Direkt serbest radikalleri temizleyerek veya indirekt yoldan antioksidan enzimleri aktive ederek dokuların hasara uğramasını geciktirebilir. Ayrıca lipit peroksidasyonunu engellediği ve hücreleri oksijen ve nitrojen kaynaklı serbest radikallerden koruduğu bilinmektedir.¹⁷²⁻¹⁷⁴ Birçok toksine bağlı oluşan serbest radikal hasarı, melatoninin antioksidan aktivitesiyle düzenlenebilir.¹⁷⁵⁻¹⁷⁷ Yapılan çalışmalarda iskemi-reperfüzyon veya ilaç kullanımına bağlı intestinal veya gastrik hasarın^{178, 179}, kemoterapik ajanların oluşturduğu multipl organ hasarının^{180, 181} ultraviyole ışınlarıyla oluşan doku hasarının¹⁸², DM'de oluşan serbest radikal hasarının^{183, 184} ve

kemoterapi veya radyoterapiye bağlı oluşan lezyonların^{185, 186} melatonin ile geriletebileceği gösterilmiştir.

Yaşlanma zerine etkisi: Yaşlanma ile melatonin sentezindeki azalışa bağlı olarak melatoninin sirkadiyan ritmi bozulmaktadır. Yaşlı insanlarda ölçülen plazma melatonin konsantrasyonu normal değerinden yaklaşık %40-50 daha düşük bulunmaktadır. Yapılan hayvan çalışmalarında da hayvan yaşlandıkça sirkadiyan ritmin bozulduğu, gündüz ve geceye ait serum melatonin konsantrasyonlarının hemen hemen eşit düzeye geldiği saptanmıştır.¹⁶² Bununla birlikte gece vakti ışığa maruz kalındığında melatonin seviyesinin azalmasına bağlı olarak yaşlılık belirtilerinin oluşması, melatoninin yaşlılığa karşı koruyucu bir etki gösterdiğini düşündürtmektedir.¹⁸⁷

İmmun sisteme etkisi: Melatonin hormonu hipotalamustaki tiroid uyarıcı hormonu uyararak, immün düzenleyici, timotropik ve anti-stres etkilerini gösterir. Hücresel bağışıklığı direkt ve indirekt yollarla etkiler.¹⁸⁸ Pinealektomi işlemiyle yapılan alışmalar^{188, 189} melatonin sentezinin azalmasına bağlı olarak, immün fonksiyonlarda bir azalma görüldüğü, eksojen olarak uygulanan melatonin hormonunun ise immün cevabı tekrardan uyardığı gösterilmiştir. Melatoninin immün cevaba etkisini inceleyen başka alışmalarda^{190, 191} da melatoninin immün fonksiyonu düzenlediği görülmektedir. Bu bağlamda melatonin uygulamasının immün sistem için özellikle de hücresel immunitenin aktivasyonu için önemli olduğu düşünülmektedir.¹⁹²

İmmün sistem üzerinde negatif etkileri olduğu bilinen durumlar (r; stres, immunsupresif kullanımı) melatonin ile kontrol altına alınabilmektedir.¹⁹³ Doğal immunitenin eksojen melatonin verilmesi ile kontrol altına alınabilir. Yapılan hayvan alışmaları NK aktivitesinin pinealektomi işlemi sonrasında azaldığını gösterir. Bu hayvanlara eksojen melatonin verildiğinde 1-2 hafta içinde hem NK hem de monosit

sayılarında artış izlendiği rapor edilmiştir. Melatoninin kemik iliğinde de bulunması hem NK hem de monositler üzerinde etkisi olduğunu göstermektedir. Ayrıca melatonin makrofaj fonksiyonunu ve sitokinlerin üretimini de etkilemektedir. T hücrelerinin apoptozisini azaltır. T helper 1 (Th1) hücreleri üzerinden interferon gama (IFN- γ), IL-2, IL-10 ve TNF- α salınımını uyarır.¹⁹⁴

2.6. Melatonin ve Periodontitis

Periodontitis, mikrobiyal dental plak ile konağın bağışıklık sistemi arasındaki etkileşim ile oluşan kronik inflamatuvar bir hastalıktır.¹⁹⁵ Cerrahi ve cerrahi olmayan çeşitli tedavi seçeneklerine rağmen, periodontitisin küresel prevalansı hala oldukça yüksektir (%40-90).¹⁹⁶ Oksidatif stresin periodontal hastalıklardaki rolü dikkate alındığında, antioksidan ajanların periodontitis tedavisinde fayda sağlayabileceği düşüncesi gündeme gelmektedir.¹⁹⁷ Bu bağlamda çeşitli antioksidanların terapötik etkileri üzerine çok sayıda çalışma yapılmıştır.^{169, 197-202}

Bir konak modülatör ajanı olarak melatoninin periodontitis tedavisindeki rolüne yönelik güncel klinik ve deneysel pek çok çalışma literatürde mevcuttur.^{152, 195, 196, 203, 204} Melatonin, serbest radikallerin dejeneratif etkilerinden hücreleri korur, tip I kollajen liflerin üretimini uyarır ve osteoblastik ve osteoklastik aktiviteleri modüle ederek kemik oluşumunu iyileştirir.¹⁹⁷ RANKL aracılı osteoklast aktivasyonunu azaltarak kemik rezorpsiyonunu engeller.¹⁹⁸ Hem proinflamatuvar hem de antiinflamatuvar sitokinleri modüle ederek²⁰⁵ dişetindeki inflamatuvar durumu hafifletebilir.¹⁶⁹ Böylece, melatoninin inflamatuvar hastalıkların tedavisinde değerli bir strateji olabileceği anlaşılmaktadır.¹⁶⁹

Kara ve ark.¹⁶⁹ deneysel periodontitisli ratlarda melatoninin periodontal dokulardaki oksidatif hasarı önemli ölçüde azalttığını bulmuşlardır. Destekler şeklinde Köse ve ark.¹⁹⁸ deneysel periodontitis rat modelinde melatonin tedavisinin alveoler kemik

rezorpsiyonunu önemli ölçüde inhibe ettiğini ve periodontal iyileşmeye katkıda bulunduğunu ortaya koymuşlardır.

Bununla birlikte Köse ve ark.¹⁹ deneysel periodontitis oluşturulan diabetik ratlarda sistemik melatonin uygulamasının, dişeti dokusunda oksidatif lipit ve DNA hasarını önemli ölçüde sınırlandırdığını, hücre içi antioksidan olan GSH seviyelerinin ve serum TAOK düzeylerinin arttığını, TOD ve OSİ düzeylerinde ise düşüş görüldüğünü raporlamışlardır.

Vücut sıvılarına geçebilen melatonin ağız boşluğuna salınıp tükürük aracılığıyla da periodontal dokular üzerinde koruyucu etkilere sahip olabilir.²⁰⁶ Periodontal hastalıklar ile tükürük melatonin seviyeleri arasındaki ilişki birçok çalışmada değerlendirilmiş^{206, 207} ve tükürük seviyelerinin periodontal hastalığın derecesine göre değiştiği gösterilmiştir. Hastalığın şiddeti arttıkça, tükürük melatonin seviyeleri azalır. Bu da melatoninin bakteriyel yüke karşı koruma görevini üstlenebileceğini göstermektedir.²⁰⁶ Topikal melatonin ile hastaların tedavi edildiği bir çalışmada¹⁸ gingival index (Gİ) skoru ve cep derinliğindeki azalma, tükürük konsantrasyonlarında RANKL'in azalması ve OPG'nin artması ile ilişkilendirilmiştir. Böylece melatoninin osteoklastogenezi yavaşlatmada, alveoler kemiğin kalitesini artırmada ve periodontal hastalığın ilerlemesini önlemede olumlu bir etkiye sahip olabileceğini düşündürmektedir.¹⁸

2.7. Melatonin ve Böbrek

Melatoninin antihipertansif, antifibrozis, antiinflamatuvar, antiapoptotik ve antioksidan gibi etkileri sayesinde birçok organ ve dokuda koruyucu etkilere sahiptir.^{208.}

Deneyisel modellerde melatonin uygulamasının böbrek dokusundaki yapısal ve fonksiyonel hasarları sınırladığı ve nefrotoksisiteye karşı kullanılan önemli bir antioksidan olduğu gösterilmiştir.^{13, 16, 20, 24, 210, 211} Potic ve ark.¹⁶ karbon tetraklorür (CCl₄) ile indüklenen akut böbrek hasarlı ratlarda tek doz melatonin tedavisinin (50 mg/kg) böbrek hasarı molekülü-1 düzeyini ve oksidatif stresi belirgin olarak baskıladığını tespit etmişlerdir. Bunun yanı sıra, böbreklerdeki yapısal hasarların (parankimatöz dejenerasyon, inflamatuvar infiltrat, vasküler tıkanıklık, tübüler dejenerasyon) azaldığını ve fonksiyonel kapasitenin ise desteklendiğini göstermişlerdir. Destekler şekilde CCl₄'e bağlı böbrek hasarı oluşturulan başka çalışmalarda da^{212, 213} melatoninin koruyucu etkisi tespit edilmiştir. Alınan serum örneklerinde melatonin ile tedavi edilen CCl₄ grubunda melatoninin, üre düzeylerini ve histolojik olarak da böbrek dokusunda görülen dejeneratif hasarı önemli ölçüde azalttığı saptanmıştır.

Renal proksimal tübüller toksik maddelere karşı oldukça duyarlıdır. Bu tübüller fazla miktarda mitokondri içerir²¹⁴ ve mitokondriyal hasar mekanizmasının, ABH'de tübüler hücre nekrozu ve apoptotik süreçte önemli rol oynadığı düşünülmektedir.²¹⁵ Apoptoz mekanizmasında proapoptotik faktör kaspaz-3 önemli rol oynamaktadır.¹²⁵ Melatonin hücre apoptozunu/nekrozunu engellemesinde ve kaspaz-3 aktivitesininin bloke edilmesinde önemli bir role sahiptir.^{124, 125}

İskemi/Reperfüzyon (İ/R) yöntemiyle ratlarda renal hasar oluşturulan birçok çalışma^{124, 216-218} histolojik olarak incelediklerinde kontrol grubuna göre anlamlı dejereneratif değişiklikler göstermiştir. Melatonin uygulanan İ/R gruplarında bu bulgularda önemli derecede azalma görülürken ROT'a bağlı oksidan aktivitenin azaldığı, antioksidan etkinin ise arttığı saptanmıştır.

Melatoninin koruyucu etkileri, hipertansiyona bağlı nefropatinin birkaç modelinde de gösterilmiştir.^{24, 219, 220} Bu çalışmalara göre melatonin tedavisi kan basıncını ve böbrek hasarını azaltırken, oksidatif stres belirteçlerinin yükselmesini önlemiştir.

Elmubarak ve ark.²²¹ melatonin tedavisinin antioksidan, antiinflamatuvar ve apoptozis düzenleyici etkileri yoluyla CCl4 ilişkili yapısal ve fonksiyonel böbrek hasarlarını etkili bir şekilde sınırladığını, bu bağlamda önemli bir tedavi alternatifi olabileceğini vurgulamışlardır.

2.8. Periodontitis, Böbrek ve Melatonin

Literatür incelendiğinde, periodontitis ilişkili muhtemel böbrek hasarının tedavisinde melatoninin koruyucu etkisini inceleyen bir tane çalışmaya ulaşılabildi.¹⁰ Bu alışmada Glle ve ark. LPS ile indüklenen rat modelinde karaciğer, böbrek ve akciğer hasarını ve muhtemel hasarın tedavisinde melatoninin terapötik etkinliğini araştırmışlardır. Sonuçta kontrol grubuna kıyasla periodontitisli ratların böbreklerinde histolojik düzeyde belirgin bir farklılık izlenmediğini tespit etmişlerdir. Dolayısıyla melatoninin (50 mg/kg, 10 gün boyunca günlük) terapötik etkinliği de sınırlı bulunmuştur.¹⁰

Bu bağlamda, uzmanlık tez çalışmamızın iki temel amacı; ligatürle indüklenen deneysel periodontitis modelinde, 1) periodontitisin böbrek yapı ve fonksiyonları üzerine muhtemel etkileri ile 2) sistemik melatonin uygulamasının tedavi edici etkinliğini biyokimyasal, histopatolojik ve immunohistokimyasal olarak kapsamlı bir şekilde araştırmak idi.

3. MATERYAL VE METOD

Bu çalışmanın deney protokolü Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi (RTEÜ) Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından gözden geçirilmiş ve 2019/24 sayılı etik kurul onayı ile deney hayvanlarının yaşam kalitesini ve refahını etkileyecek faktörler düşünülerek etik kurul yönergelerinde belirtilen kurallara uygun şekilde deneysel çalışma gerçekleştirilmiştir. RTEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi TSA-2018-904 nolu proje ile bu çalışma desteklenmiştir.

3.1. Deney Hayvanlarının Temin Edilmesi ve Barınması

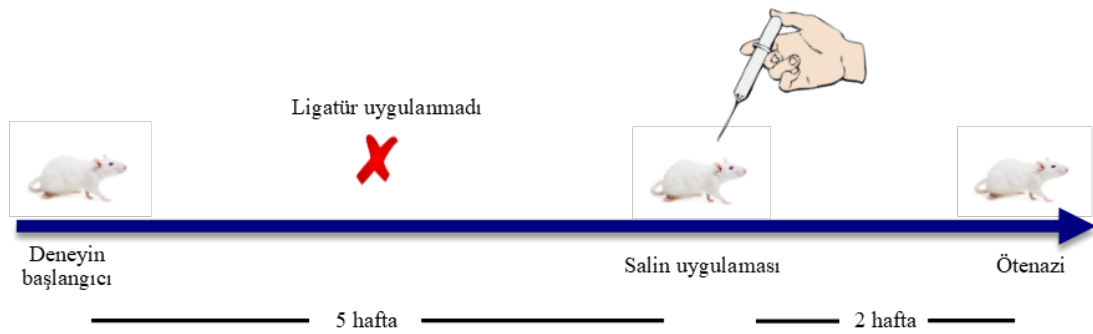
Bu deneysel çalışma RTEÜ Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde gerçekleştirildi. Çalışma için kullanılan deney hayvanları 250-300 gram (gr) ağırlık aralığında her grupta 8 hayvan olacak şekilde toplam 24 adet Sprague Dawley cinsi erkek rat olarak belirlendi. Kullanılan tüm hayvanlar, Ulusal Bilimler Akademisi tarafından hazırlanan ve Ulusal Sağlık Enstitüleri tarafından yayınlanan "Laboratuvar Hayvanlarının Bakımı ve Kullanımı Kılavuzu" nda belirtilen kriterlere göre gerekli olan bakımı aldı. Biyolojik ve fizyolojik olarak aynı özelliklere sahip bu hayvanlar; deney hayvanları ünitesinde hijyenik koşullar altında, $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ortam sıcaklığında, %58 bağıl nem oranına sahip, ışık periyodunun 6.00-19.00 saatleri arasında sağlandığı ortamda muhafaza edildi. Ratlar içeriği aşağıda belirtilen standart pellet rat yemi (270 kcal / 100 gr, Bayramoğlu Yem, Erzurum, Türkiye) ile beslendi (Tablo 3.1).²²² Suya sınırsız erişimleri (ad libitum) sağlandı. Temin edilen ratların laboratuvar koşullarına adaptasyonu için 1 hafta beklendi. Takiben ratlar rastgele olarak 3 gruba ayrıldı: deneysel periodontitis (Dp), deneysel periodontitis-melatonin (Dp-Mel) ve kontrol grubu.

Tablo 3.1. Deney hayvanlarına verilen standart pellet rat yeminin içeriği

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

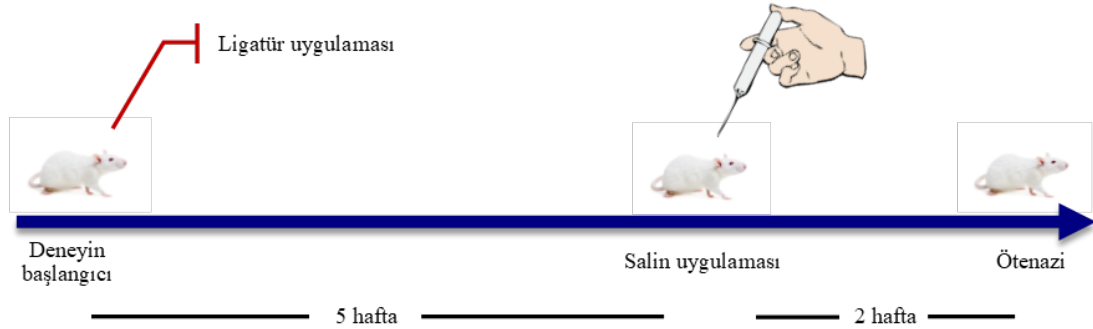
3.1.1. Çalışma Grupları

1) Kontrol grubu (Grup 1): Bu gruba 8 rat dahil edildi. Ratların alt 1. molar dişlerine ligatür bağlanmadı. 6. haftanın ilk gününden itibaren 14 gün boyunca intraperitoneal olarak gece 11:00 de 10 mg/kg günlük tek doz şeklinde salin uygulandı. 8. haftanın ilk gününde hayvanlar sakrifiye edildi. Sakrifiye edilmeden önce idrar ve serum örnekleri toplandı.



2) Deneysel periodontitis (Dp) grubu (Grup 2): Bu gruba 8 rat dahil edildi. Ratların mandibular 1. molar dişlerine 3.0 steril ipek ligatür bağlanarak deneysel periodontitis oluşturuldu. 6. haftanın ilk gününden itibaren 14 gün boyunca intraperitoneal olarak gece 11:00 de 10 mg/kg günlük tek doz şeklinde salin uygulandı.

8. haftanın ilk gününde hayvanlar sakrifiye edildi. Sakrifiye edilmeden önce idrar ve serum örnekleri toplandı.



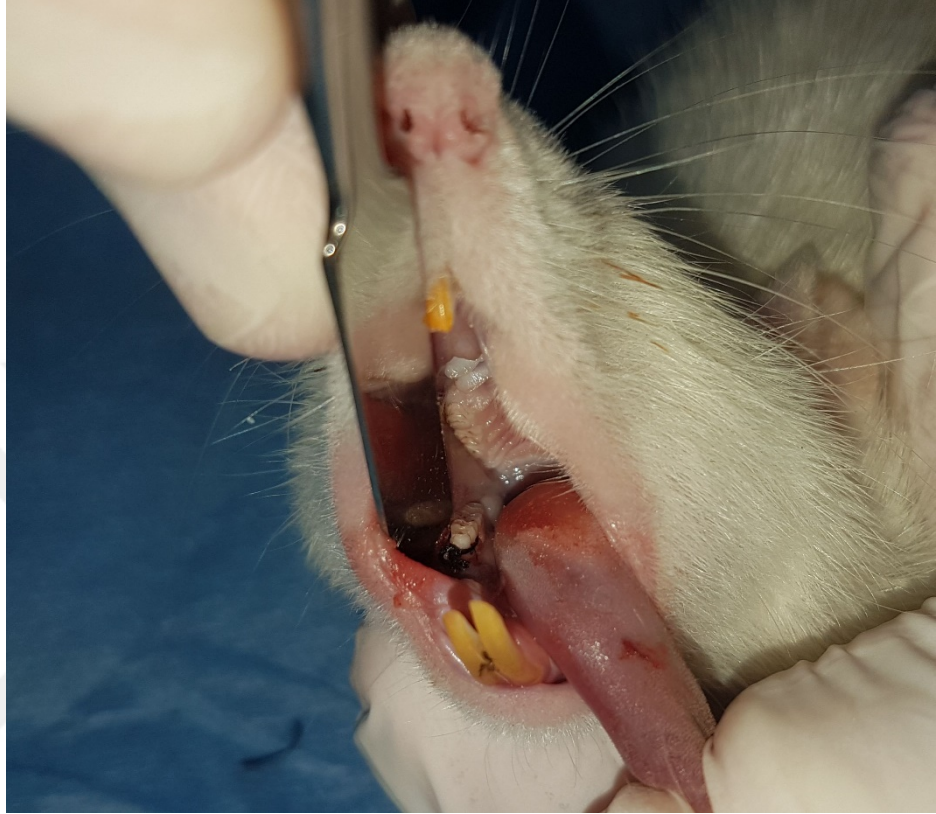
3) Deneysel periodontitis + melatonin grubu (Dp+Mel) (Grup 3): Bu gruba 8 rat dahil edildi. Gruptaki ratların mandibular 1. molar dişlerine 3.0 steril ipek ligatür bağlanarak deneysel periodontitis oluşturuldu. 6. haftanın ilk gününden itibaren 14 gün boyunca intraperitoneal olarak gece 11:00 de 10 mg/kg günlük tek doz şeklinde melatonin uygulandı. 8. haftanın ilk gününde hayvanlar sakrifiye edildi. Sakrifiye edilmeden önce idrar ve serum örnekleri toplandı.



3.2. Ligatür ile Periodontitis İndüksiyonu

Deneysel periodontitis modelinin oluşturulması için intraperitoneal olarak ksilazin hidroklorid (Rompun, Bayer, İstanbul, Türkiye) 10 mg/kg ve ketamin hidroklorid (Ketalar, Pfizer, İstanbul, Türkiye) 40 mg/kg enjeksiyonları ile hayvanların anestezisi sağlandı. İhtiyaç halinde başlangıç dozunun %20' si aralıklı olarak tekrar edildi. Sonrasında, hem sağ hem sol alt 1.molar dişlerinin servikal bölgesine sub-paramarjinal pozisyonda 3.0 ipek suture geçirilerek mezial tarafta düğümlendi ve suture 5 hafta süre ile

yerinde muhafaza edilerek deneysel periodontitis oluşturuldu. Sütür, yapısı ve pozisyonu ile ilişkili olarak plak birikimine, inflamatuvar değişikliklere ve sonuçta da periodontitis oluşumuna imkan tanıdı (Şekil 3.1).^{19, 166, 223}



Şekil 3.1. Ratlara ligatür bağlanması

3.3. Melatonin Uygulanması

Melatonin (Alfa Aesar GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Almanya) %0.01'lik serum fizyolojik-etanol çözeltisi içinde taze olarak çözdürüldü. Çözünen bu karışım vortekslenerek hazır hale getirildi. Önceki çalışmalara^{19, 166} benzer şekilde 6.haftanın ilk gününden itibaren 14 gün süre ile intraperitoneal olarak gece 11:00 de 10 mg/kg günlük tek doz şeklinde insulin enjektörü ile uygulandı. Kontrol ve Dp gruplarında ise aynı metodolojiyle salin uygulaması yapıldı. Deneye başlamadan önce ve deney süresince periyodik olarak ratların ağırlıkları ölçüldü ve hayvanların değişen ağırlıklarına göre tartı (Amput Electronic Technology Co., Shenzhen, Guangdong, Çin) kullanılarak melatonin

doz ayarlaması yapıldı. Deneyin 8. haftasının ilk gününde 50 mg/kg sodyum pentobarbital enjeksiyonu yapılarak derin anestezi altında tüm ratlar sakrifiye edildi. Histolojik, biyokimyasal ve radyolojik analizler için sakrifikasyondan önce idrar ve kan, sakrifikasyondan sonra ise doku örnekleri alındı.

3.4. Örneklerin Toplanması ve Hazırlanması

Böbrek fonksiyonel kapasitesini değerlendirmek amacı ile idrar (kreatinin) ve serum (kreatinin, üre, sistatin C) örnekleri temin edildi. Ratlar deneyin tamamlanacağı gün (7. haftanın son günü) metabolik kafeslere yerleştirildi ve idrar örnekleri toplandı. Toplanan idrar örnekleri eppendorf tüplere aktarıldı ve çalışma gününe kadar RTEÜ Diş Hekimliği Fakültesi'nde bulunan -80°C dondurucuda (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, ABD) muhafaza edildi (Şekil 3.1). Takip eden gün (8. haftanın ilk günü) ise tüm gruplarda yukarıda açıklandığı şekli ile tekrar anestezi sağlandı ve 10 ml'lik enjektörler ile intrakardiyak sol ventriküler kan örnekleri toplandı. Toplanan kan örnekleri + 4°C'de 1739 g'de 15 dk süre ile santrifüj edilerek serum örnekleri elde edildi. Elde edilen kan serumları (süpernatantlar) eppendorf tüplere koyularak -80°C derin dondurucuda analiz edilecek güne kadar muhafaza edildi. Ratların kanları alındıktan hemen sonra öldürücü doz sodyum pentobarbital enjeksiyonu (50 mg/kg) ile ötenazi uygulandı. (Ötenazi: LT, KA) Periodontal incelemeler için 1.molar dişleri içeren mandibular dokular çevresindeki dokular ile birlikte çıkarıldı (Şekil 3.2). Böbrekteki yapısal değişikliklerin değerlendirilmesi amacıyla böbrekler diseke edildi. Sağ böbrek ve sağ mandibula örnekleri histolojik ve immünohistokimyasal analizler için %10 nötral formaldehit solüsyon içeren kaplara aktarıldı. Sol mandibula örnekleri mikro bilgisayarlı tomografik incelemeler için muhafaza edildi. Sol böbrek dokuları ise soğuk fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkanmalarını takiben, hızlı bir şekilde filtre kağıdı ile nemleri alındı ve biyokimyasal analizler için -80°C dondurucuya aktarıldı (Şekil 3.3). Hem

histolojik hem de biyokimyasal incelemeler, çalışma grubu tayininden habersiz iki uzman araştırmacı tarafından gerçekleştirildi. (Biyokimya: KA, AY; Histoloji: TM, LT)



Şekil 3.2. Sağ mandibular doku 6rneği ve 1. molar dişin etrafındaki ligat6r6n g6r6n6m6



Şekil 3.3. -80°C derin dondurucu

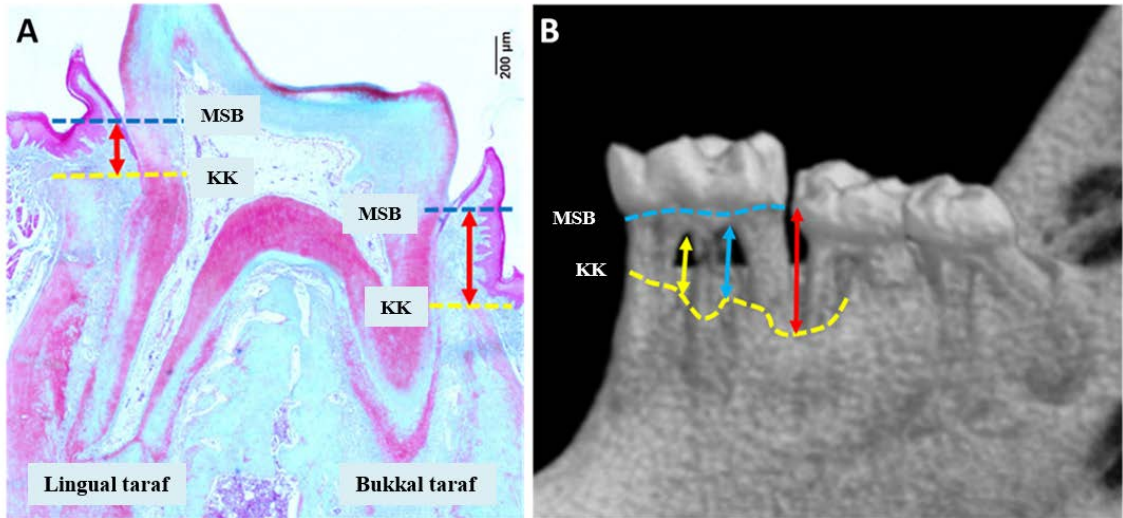
3.5. Alveolar Kemik Kayıplarının Belirlenmesi

3.5.1. Histomorfometrik Analizler

Tüm gruplardan histolojik analizler için alınan sağ mandibula doku örnekleri 72 saat boyunca %10 nötral formaldehit içinde fikse edildi. Fikse edilen dokular histolojik incelemeye uygun hale getirmek amacıyla 15 gün boyunca %6 nitrik asit ile dekalsifiye edildi. Yeterli dekalsifikasyon sağlandıktan sonra örneklerin her biri, 3 saat süreyle sodyum bikarbonat ile nötralizasyon işlemine tabi tutuldu. Alkol ile dehidratasyonu takiben ksilen ile temizlendi ve parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklar bukkolingual yönde 5 µm kalınlığında seri olarak kesildi ve her bloktan morfometrik analizlerde kullanılmak üzere 10 kesit rastgele olarak seçildi. Seri kesitler, Crossman tarafından modifiye edilmiş Mallory'nin üçlü boyama tekniği ile boyandı. Dişlerin bukkal ve lingual taraflarındaki alveolar kemik düzeyleri mine sement birleşimi (MSB) ile alveolar kemik kreti (KK) arasındaki mesafe olarak ölçüldü (Şekil 3.4.A). Değerlendirmeler bir analiz yazılımı (Olympus DP2-BSW, Tokyo, Japonya) ile entegre edilmiş trinoküler ışık mikroskobu kullanılarak yapıldı.

3.5.2. Radyomorfometrik Analizler

Sakrifiye edilen ratlardan elde edilen sol mandibula doku örnekleri molar dişler bölgesini kapsayacak şekilde trimlendi. Dokular plastik tüpler içerisine pamukla konumlandırıldı. Bruker SKYSCAN 1174 mikro-CT tarayıcı (Kontich, Belçika) ile 50 kV, 800 µA, 30,51 görüntü piksel boyutunda parametrelerle örnekler tarandı. Görüntülerin yeniden yapılandırılması NRecon Software (Bruker, Kontich, Belçika) kullanılarak yapıldı. Meziyal ve distal furkasyon ile distal köklerin distal tarafındaki kemik kaybı düzeyleri MSB ve KK arasındaki mesafe olarak ölçüldü (Şekil 3.4.B).



Şekil 3.4. MSB ve KK arasındaki mesafenin histomorfometrik ve radyografik ölçümü

A. Bukkal ve lingual yönlerden MSB ve KK arasındaki mesafenin histomorfometrik ölçümü (Crossman'ın modifiye ettiği Mallory'nin üçlü boyama tekniği) mavi çizgi; MSB, sarı çizgi; KK

B. Meziyal ve distal furkasyon ile distal köklerin distal tarafındaki MSB ve KK arasındaki mesafenin radyografik ölçümü

3.6. Biyokimyasal Analizler

3.6.1. Çalışmada Kullanılan Araç ve Gereçler

Biyokimyasal analizler için RTEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Laboratuvarındaki cihazlar kullanılmıştır (Tablo 3.2).

3.6.2. Kullanılan Kimyasal Materyaller ve Marka Adları

1. Tiyokarboksilik asit (TCA) - Merck
2. Tiyobarbitürik asit (TBA) – Merck
3. Folin-ciocalteu reaktifi - Merck
4. %96'lık etil alkol – Smyras
5. 1, 1, 3, 3 tetrametoksiopropan (TEP) – Fluka
6. Sodyum klorür (NaCl) - Hımedia
7. Dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4) - Hımedia
8. Potasyum hidrojen fosfat (KH_2PO_4) - Hımedia
9. Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) - Hımedia
10. Monosodyum fosfat (NaH_2PO_4) - Hımedia

11. 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB) - Himedia

12. Tri sodyum sitrat - Himedia

13. Sodyumkarbonat (Na_2CO_3) – Sigma

Tablo 3.2. Biyokimya laboratuvarında kullanılan cihazlar ve marka adları

Cihaz Adı	Cihaz Markası
Homojenizatör	Tissue Lyser II, Qiagen
Santrifüj	Thermo Scientific, Heraeus Multifuge
Eliza Okuyucu	Thermo Scientific, Multiskan GO
Eliza Yıkayıcı	Biotek, EL × 50
Su Banyosu	Memmert WNB 14
Etüv	Memmert, UF 55
Hassas Terazı	Acculab
Manyetik Karıştırıcı	WiseStir, MSH 20 A
Otomatik pipet	Brand

3.6.3. Doku Homojenatlarının Hazırlanması

Sol böbrekten alınan doku örnekleri fosfat tamponu ile kandan arındırılarak -80°C derin dondurucuda muhafaza edildi. Çalışılacağı zaman -80°C den çıkarılıp homojenizasyon işlemine başlandı. Homojenizasyon boyunca doku örnekleri buz kütlesi içerisinde muhafaza edildi. Dokuların homojenizasyonu için pH'ı 7,4 olan PBS hazırlandı. PBS için 0,435 gr Na_2HPO_4 ve 0,302 gr NaH_2PO_4 kimyasal maddeleri tartıldı. Tartılan bu kimyasallar distile su ile 500 ml'ye tamamlandı ve pH 7,4'e ayarlandı. 0.5 gr böbrek doku örnekleri hassas terazı ile tartılarak eppendorf tüplerin içine kondu ve doku ağırlığının 2 katı olacak şekilde PBS eklendi. Eppendorf tüplerin açılmaması için kapakları parafilm ile kaplandı. Doku örnekleri tekrardan buz kütlesinin içerisinde yerleştirildi. Bütün örnekler homojenizatörle (Tissue Lyser II, Qiagen, Almanya), 30

hertz frekansta 5 dk boyunca homojenize edildi. Tam homojenize olmayan doku örnekleri 5 dk daha homojenizasyona tabi tutuldu. Doku homojenizatları, 4°C'de 15 dk boyunca 3.000 g'de santrifüjlendi (Thermo Scientific, Heraeus Multifuge, Waltham, Massachusetts, ABD). Elde edilen süpernatant kısımları, MDA, GSH, TOD, TAOK, TNF- α , IL-1 β , MMP-8, MMP-9, ve KtD seviyelerini analiz etmek için kullanıldı. Tüm sonuçlar gr dokuya bölünerek ifade edildi.

3.6.4. Doku Malondialdehit Düzeylerinin Belirlenmesi

Deneyin Prensibi: Lipit peroksidasyonunun son ürünü olan MDA ölçümü, Draper ve Hadley'in metoduna göre yapıldı. MDA'nın TBA ile reaksiyonu sonucu oluşan pembe renkli kompleksin absorbansının 532-535 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır.²²⁴

3.6.4.1. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

1. 10 g TCA deiyonize su ile çözülerek 100 ml'ye tamamlandı
2. 0.67 g TBA deiyonize su ile çözülerek 100 ml'ye tamamlandı.
3. Standartları hazırlamak için %40'lık etanol hazırlandı. 25 μ L TEP alınarak %40'lık etanol ile 25 ml'ye tamamlanarak standartlar 41,8 - 20,9 - 10,47 - 5,22 - 2,43 μ mol/L şeklinde hazırlandı.

3.6.4.2. Deneyin Yapılışı

Böbrek dokuları homojenize edildikten sonra süpernatanttan 1000 μ L alındı ve üzerine %10'luk 1000 μ L TCA eklendi. Vorteks edilip 15 dk 94°C lik su banyosunda bekletildi. Daha sonra su banyosundan alınan tüpler soğutuldu. 4600 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüjden sonra süpernatanttan 400 μ L alınarak temiz eppendorf tüpüne aktarıldı ve %67'lik TBA çözeltisinden 200 μ L eklenerek vortekslendi. 94°C su banyosunda 15 dk boyunca tekrar bekletildi. Numuneler soğutulup plate kuyucuklarına

pipetlenerek spektrofotometrede 532 nm'de pembe renkli kompleks ürünün absorbanısı ölçüldü. Standart grafikten hesaplama yapıldı ve sonuçlar nmol/gr doku şeklinde ifade edildi.

3.6.5. Doku Glutasyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Deneyin Prensibi: Böbrek glutasyon düzeyinin ölçülmesinde Ellman yöntemi kullanıldı. Bu yöntemin prensibi; böbrek homojenatındaki serbest sülfidril gruplarının, Ellman reaktifi olarak da bilinen DTNB ile oluşturduğu sarı rengi 412 nm'de spektrofotometrik olarak ölçerek sonucu belirlemektir.²²⁵

3.6.5.1. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

1. Na₂HPO₄ için 4,25 gr Na₂HPO₄ deiyonize suda çözülerek 100 ml'ye tamamlandı.
2. Ellman ayıracı: 0,004 gr DTNB tartılarak %1'lik sodyum sitrat çözeltisiyle 10 ml'ye tamamlandı.
3. Standartlar stok glutatyondan; 100 - 80 - 60 - 40 - 20 - 10 - 5 µmol/L şeklinde hazırlandı.

3.6.5.2. Deneyin Yapılışı

Böbrek dokuları homojenize edildikten sonra eppendorf tüpün içine süpernatanttan 100 µL alındı ve üzerine 400 µL 3M Na₂HPO₄ ve 100 µL Ellman solüsyonu eklendi. Daha sonra vortekslenerek her bir örnekten 250 µl kadar plate kuyucuklarına pipetlendi. Oluşturulan sarı renkli kompleksin absorbanları, bir spektrofotometre cihazında 412 nm'de okutuldu. Standart grafikten hesaplama yapıldı ve sonuçlar nmol/gr doku şeklinde ifade edildi.

3.6.6. Doku Total Oksidan Düzeylerinin Belirlenmesi

Kitin Prensibi: Böbrek dokusundan elde edilen süpernatantların TOD seviyeleri, Erel tarafından geliştirilen yeni bir otomatik kolorimetrik ölçüm yöntemiyle hesaplandı.⁸² Doku örneğinde bulunan oksidanlar, ferröz iyon-o-dianisidin kompleksini ferrik iyona

oksidler. Oksidasyon reaksiyonu, ortamda bol miktarda bulunan gliserol molekülleri tarafından güçlendirilir. Ferrik iyon, asidik bir ortamda *xylene orange* ile renkli bir kompleks oluşturur. Doku örneğinde bulunan oksidan moleküllerin toplam miktarıyla ilişkili olan renk yoğunluğu spektrofotometrik olarak ölçülür.

Bu çalışmada piyasada bulunan Rel Assay Diagnostics markalı TOD ticari kitleri (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep, Türkiye) kullanıldı. Kit katalogunda belirtilen prosedürlere uygun olarak çalışıldı.

3.6.6.1. Kitin Çalışma Prosedürü

45 µl doku örneğinin bulunduğu küvete ilk önce 300 µl Reaktif 1 solüsyonundan ilave edildi ve 30 saniye (sn) bekledikten sonra 530 nm’de ilk absorbansı okundu. Daha sonra aynı küvete 15 µl Reaktif 2 solüsyonu eklendi ve oda sıcaklığında 10 dk bekledikten sonra 530 nm’de 2. kez absorbansı okundu. Test, hidrojen peroksit ile kalibre edildi ve sonuçlar µmol H₂O₂ eşdeğeri/gr protein olarak ifade edildi.

3.6.7. Doku Total Antioksidan Düzeylerinin Belirlenmesi

Kitin Prensipleri: Böbrek dokusundan elde edilen süpernatantların TAOK seviyeleri, Erel tarafından geliştirilen yeni bir otomatik ölçüm yöntemiyle hesaplandı.²²⁶ Doku örneğinde bulunan antioksidanlar, koyu mavi-yeşil renkli 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) radikalini renksiz ABTS formuna indirgemekte yani renk oluşumunu baskılamaktadır. Doku örneğinde bulunan antioksidan moleküllerin toplam miktarıyla ilişkili olan absorbans değişikliği spektrofotometrik olarak ölçülür. Bu çalışmada piyasada bulunan Rel Assay Diagnostics markalı TAOK ticari kitleri (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep, Türkiye) kullanıldı. Kit kataloglarında belirtilen prosedürlere uygun olarak çalışıldı.

3.6.7.1. Kitin Çalışma Prosedürü

18 µl doku örneğinin bulunduğu küvete ilk önce 300 µl Reaktif 1 solüsyonundan ilave edildi ve 30 sn bekleddikten sonra 660 nm’de ilk absorbansı okundu. Daha sonra aynı küvete 45 µl Reaktif 2 solüsyonu eklendi ve oda sıcaklığında 10 dk bekleddikten sonra 660 nm’de 2. kez absorbansı okundu. Test, bir E vitamini analogu olan Trolox Eşdeğeri ile kalibre edildi ve sonuçlar µmol Trolox eşdeğeri/gr protein olarak ifade edildi.

3.6.8. Oksidatif Stres İndexinin Hesaplanması

TOD/TAOK yüzde oranı olan OSİ=[(TOD (µmol H₂O₂ eşdeğeri/L)/TAOK (µmol Trolox eşdeğeri/L)] olarak hesaplandı.⁸²

3.6.9. Doku İnflamatuar Sitokin ve Enzim Düzeylerinin Belirlenmesi

Böbrek dokularından elde edilen süpernatantlarda TNF-α, IL-1β, KtD, MMP-8 ve MMP-9 seviyeleri, piyasadaki rat spesifik ELISA kitleriyle ölçüldü (Şekil 3.5). Kitle çalışırken yıkama işlemleri için eliza yıkayıcı cihaz (Biotek, ELx50, Winooski, Vermont, ABD) ve analiz etmek için eliza okuyucu cihaz (Thermo Scientific, Multiskan GO, Waltham, Massachusetts, ABD) kullanıldı (Şekil 3.6) (Şekil 3.7). Sonuçlar TNF-α, IL-1β, KtD için pg/ml ve MMP-8, MMP-9 için ng/ml olarak ifade edildi.

3.6.9.1. TNF-α, IL-1β, KtD ve MMP-8 Düzeylerinin ELISA Kitiyle Analiz

Edilmesi

Doku TNF-α (katalog no: E-EL-R0019), IL-1β (katalog no: E-EL-R0012), KtD (katalog no: E-EL-R0171) ve MMP-8 (katalog no: E-EL-R0623) düzeylerinin ölçümü için piyasadaki rat spesifik Elabscience marka (Houston, Texas, ABD) ELISA kiti kullanıldı ve kitin talimatlarına uygun olarak çalışıldı.

Kitin Prensibi: Bu ELISA kitinde, Sandwich-ELISA prensibi kullanılır. Bu kitten sağlanan mikro ELISA plakası, hangi marker incelenecekse ona özel bir antikor ile kaplıdır. Mikro ELISA plaka kuyucuklarına numuneler eklenir ve spesifik antikor ile

birleştirilir. Bir dizi prosedürden sonra incelenen marker mavi renkte görünecektir. Enzim-substrat reaksiyonu durdurma (stop) çözeltisinin eklenmesiyle renk sarıya döner. Optik yoğunluk (OD), 450 nm \pm 2 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür. OD değeri, rat TNF- α , IL-1 β , KtD ve MMP-8 konsantrasyonu ile orantılıdır. Numunelerin OD'si standart eğri ile karşılaştırılarak rat TNF- α , IL-1 β , KtD ve MMP-8 konsantrasyonları hesaplanır.

3.6.9.1.1. Kitin Çalışma Prosedürü

TNF- α , IL-1 β , KtD ve MMP-8 in analizi benzer çalışma prosedürleri uygulanarak yapıldı.

1. Plaka kuyucuklarına 100 μ L doku örneği eklendi ve 37°C'de 90 dk inkübe edildi.
2. Sıvı uzaklaştırıldı ve hemen her bir kuyucuğa 100 μ L biyotinlenmiş saptama antikorunu eklendi. 37°C'de 60 dk inkübe edildi.
3. Plaka 3 kez aspire edildi ve yıkandı.
4. 100 μ L HRP konjugatı eklendi ve 37 ° C'de 30 dk inkübe edildi. Plaka 5 kez aspire edildi ve yıkandı.
5. 90 μ L substrat reaktifi eklendi ve 37°C'de 15 dk inkübe edildi.
6. 50 μ L stop çözeltisi eklendi.
7. Plaka hemen 450 nm'de okundu.

3.6.9.2. MMP-9 Düzeylerinin ELISA Kitiyle Analiz Edilmesi

Doku MMP-9 düzeylerinin ölçümü için piyasadaki rat spesifik SinoGeneclon marka (Hangzhou, Çin) ELISA kiti kullanıldı ve kitin talimatlarına uygun olarak çalışıldı (katalog no: SG-20412).

Kitin Prensibi: Bu ELISA kitinde, Sandwich-ELISA prensibi kullanılır ve numunedeki rat MMP-9'un kantitatif seviyesi ölçülür. Bu kitten sağlanan mikrotitre

plakası MMP-9 antikoruna ile kaplıdır. Kuyucuklara numuneler eklenir ve MMP-9'a spesifik antikor ile birleştirilir. Bir dizi prosedürden sonra reaksiyon mavi renkte görünecektir. Reaksiyon, stop çözeltisinin eklenmesiyle sonlandırılır ve renk değişimi 450 nm dalga boyunda ölçülür.

3.6.9.2.1. Reaktiflerin Hazırlanması

Yıkama tamponu: 400 ml yıkama tamponu hazırlamak için 20 ml yıkama tamponu konsantresi distile suyla seyreltilmiştir.

Standardın seyreltilmesi: Her tüpte 50 µl standart seyreltme ve 5. tüpe 100 µl standart (36 ng/ml) pipetlendi. 5. tüpten 100 µl kadar 4. tüpe alındı. 4. tüpten 50 µl 3. tüpe pipetlendi ve katalogdaki gibi seyreltme serisi oluşturuldu. Seyreltilmemiş standart, 36 ng/ml olarak, numune dilüsyonu ise (boş kuyu) 0 ng / ml olarak kabul edildi.

3.6.9.2.2. Kitin Çalışma Prosedürü

1. Tüm reaktifler, standartlar ve örnekler yukarıda belirtildiği gibi hazırlandı ve kullanılacak kuyucuk sayısı ile boş bırakılacak kuyucuk belirlendi.
2. Standart kuyucuğa standarttan 50 µl, numune kuyucuğuna 40 µl numune dilüsyonu pipetlendi ve ardından test edilecek numuneler 10 µl kadar eklendi.
3. Numune kuyucuklara pipetlendikten sonra, kuyucuk duvarına mümkün olduğunca dokunmadan yavaşça karıştırıldı.
4. Yapışkan bantla kapatıldı ve 37°C'de 30 dk inkübe edildi.
5. Yıkama solüsyonu 20 kat distile su ile seyreltilmiştir.
6. Yapışkan şerit açıldı ve sıvı uzaklaştırıldı. Yıkama tamponu her kuyucuğa pipetlendi. 30 sn sonra tekrarlanacak şekilde 5 kez bu işlem yapıldı.
7. Boş kuyucuk hariç her kuyuya HRP-konjugat reaktifinden 50 µl kadar pipetlendi.

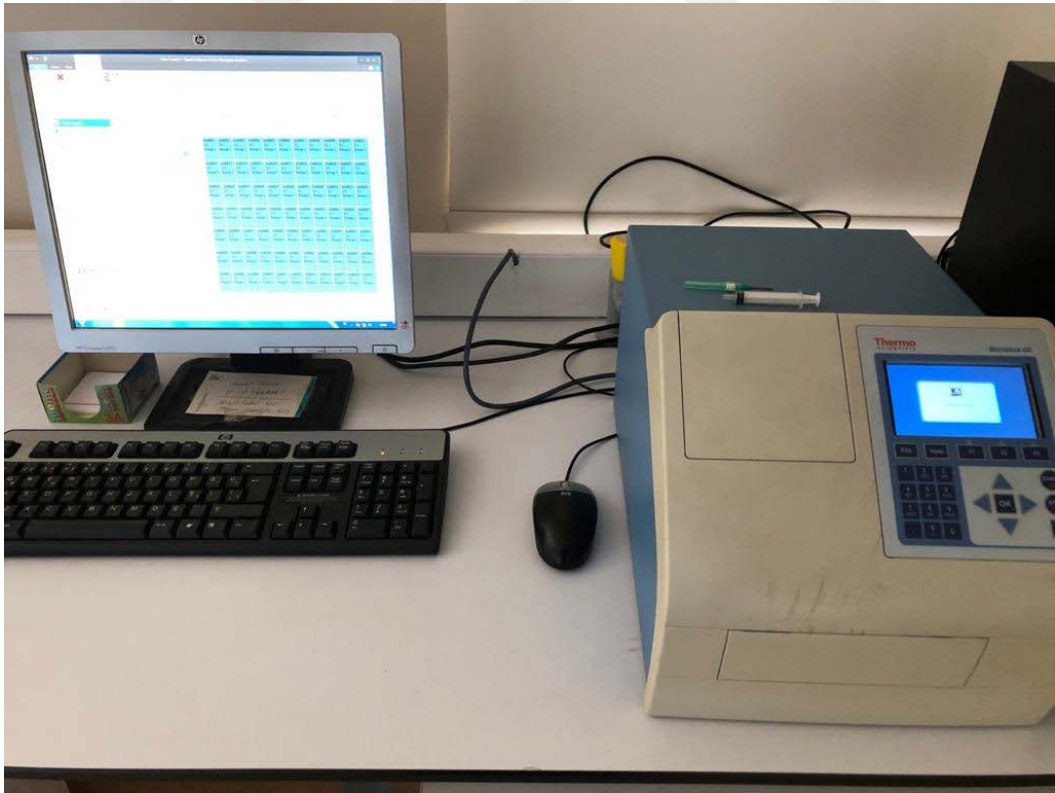
8. Her bir kuyucuğa 50 µl kromojen solüsyonu A ve 50 µl kromojen solüsyonu B pipetlendi. 37°C'de 15 dk ışık korumasından kaçınıldı.
9. Reaksiyonu durdurmak için her bir kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklendi. Stop reaksiyonu maviden sarıya dönen renk değişikliği şeklinde izlendi.
10. Stop solüsyonunun pipetlenmesinden sonra 15 dk içinde 450 nm'de absorbanısı okundu.



Şekil 3.5. Süpernatantların ELISA kiti ile incelenmesi



Şekil 3.6. Eliza yıkayıcı cihaz



Şekil 3.7. Eliza okuyucu cihaz

3.7. Böbrek Fonksiyonel Kapasitesinin Belirlenmesi

Serum üre, kreatinin ve sistatin C düzeylerinin analizi için -80°C’de muhafaza edilen kan serumları hizmet alımına gönderilmeden 24 saat önce -80°C derin dondurucudan -20°C’ye alındı ve ardından soğuk zincirle Gelişim Tıp Laboratuvarına (İstanbul, Türkiye) gönderildi. Numunelerin hepsi aynı gün ve tek seferde çalışıldı. Serum üre ve kreatinin düzeyleri Gelişim Tıp Laboratuvarında bulunan Biolabo (Lyon, Fransa) marka kitlerle ve Saturno 300 (Roma, İtalya) biyokimya otoanalizöründe çalışıldı. Serum Sistatin C düzeyleri Gelişim Tıp Laboratuvarında bulunan Siemens BNII Nefelometre cihazında (Tarrytown, New York, ABD) Siemens kitleri (Tarrytown, New York, ABD) ile çalışıldı.

İdrar kreatinin düzeyleri ise, örneklerin çalışılacağı günden 24 saat önce eppendorflar -80°C derin dondurucudan çıkartıldı ve kademeli olarak sırasıyla -20°C ve ardından 4°C’de çözünmeye bırakıldı. Oda sıcaklığına gelen örneklerin vortekslenerek homojen hale gelmeleri sağlandı. Numunelerin hepsi aynı gün ve tek seferde çalışıldı. İdrar kreatinin düzeyleri RTEÜ Eğitim Araştırma Hastanesi Biyokimya Laboratuvarında bulunan Beckman Coulter AU5800 otoanalizörü (Brea, Kaliforniya, ABD) ile Beckman Coulter marka kitler (Brea, Kaliforniya, ABD) kullanılarak ölçüldü. Sonuçlar mg/dl olarak ifade edildi.

3.8. Histopatolojik Analizler

3.8.1. Histolojik Doku Takibi Prosedürleri

Ratların sağ böbrek korteks dokusuna ait 1 cm³ hacminde trimlenmiş örnekler, %10’luk nötral formalin (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD) solüsyonu içinde 36 saat boyunca fikse edildi. Daha sonra dokular, histolojik analiz için kasetlere kondu ve doku takip cihazında (Thermo Scientific, Citadel 2000, Waltham, Massachusetts, ABD) takip edilip işlemlere devam edildi (Şekil 3.8). Böbrek dokuları %50, %60, %70, %80,

%96, %100 (x2)'lük etanol solüsyonlarından geçirilerek dehidratasyon işlemi tamamlandı (Tablo 3.3). Ksilen serilerinde bekletilerek şeffaflaştırma işlemi uygulandı. Son aşamada dokular, sıvı halde parafinin (Merck GmbH, Darmstadt, Almanya) olduğu haznelerde bekletilerek parafinin doku içine nüfuz etmesi sağlandı.



Şekil 3.8. Doku takip cihazı

Rutin doku takibi prosedürü sonrasında kasetler parafin bloklama cihazına (Leica EG 1150 H, Wetzlar, Almanya) alındı. Bloklanmış dokular soğutma ünitesinde (Leica EG 1150 C, Wetzlar, Almanya) bekletildikten sonra kesit kalitesini artırmak için -20°C 'de 3 saat daha bekletildi (Şekil 3.9).

Tablo 3.3. Böbrek dokularına ait doku takip işlemleri

Yapılan İşlem	Kullanılan Materyal	Zaman
Doku tespiti	% 10'luk nötral formalin	36 saat
Dehidratasyon	% 50'lik etanol	180 dk
	% 50'lik etanol	75 dk
	% 60'lık etanol	90 dk
	% 70'lik etanol	90 dk
	% 80'lik etanol	60 dk
	% 96'lık etanol	60 dk
	% 100'lük etanol	75 dk
	% 100'lük etanol	75 dk
Şeffaflaştırma	Ksilen	90 dk
	Ksilen	90 dk
Parafinizasyon	Parafin	60 dk
	Parafin	210 dk
Bloklama		



Şekil 3.9. Soğutma ünitesi ve parafin bloklama cihazı

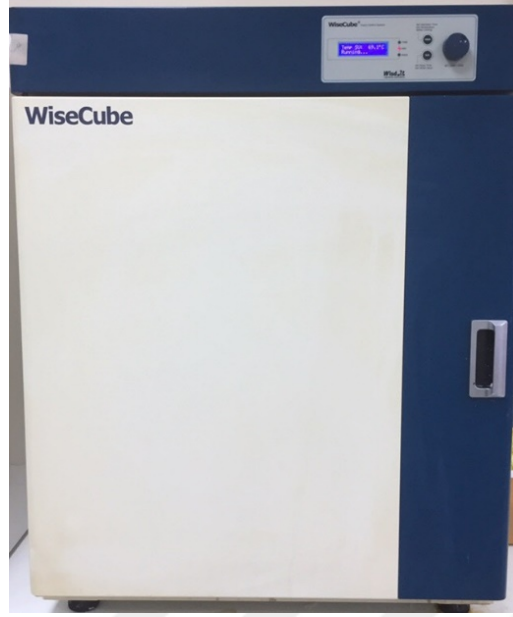
Sert parafine gömülen doku örneklerinden mikrotomda (RM2255, Leica, Wetzlar, Almanya) 3-4 µm kalınlığında seri kesitler alındı (Şekil 3.10). Kesitler 37-38°C

sıcaklıktaki distile su içeren benmari havuzuna (GFL 1052, Almanya) bırakıldı. Doku kırışıklıklarının açılması gerçekleştiikten sonra Harris hematoksilen ve Eosin G (H&E) ile boyanmak üzere lamlara (Superior Marinfeld Histobond+, Almanya) alındı.



Şekil 3.10. Rotary mikrotom cihazı

Lama alınan kesitler boyamadan önce hem dokudaki parafinin uzaklaştırılması hem de kesitlerin lama daha iyi adaptasyonu için formalinsiz bir ortamda 60°C'lik etüvde (Wisecube, Wertheim, Almanya) 1 saat bekletildi ve daha sonra boyamaya alındı (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. Etüv

3.8.2. Hematoksilen–Eozin ile Boyama Prosedürü

Dokuların genel histopatolojik görüntüsünü değerlendirmek için parafin bloklardan alınan 3-4 µm kalınlığındaki kesitler boyama cihazı (Leica ST5020, Wetzlar, Almanya) ile Tablo 3.4’de belirtildiği şekilde H&E ile boyandı (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. Hematoksilen-Eozin boyama cihazı

Tablo 3.4. Hematoksilen-Eozin ile Boyama Prosedürü

Yapılan İşlem	Kullanılan Materyal	Zaman
Deparafinizasyon	60 °C'lik etüv	1 saat
	Boyama cihazı fırın	5 dk
	Ksilen	3 dk
	Ksilen	3 dk
Rehidratasyon	%100'lük etanol	1 dk
	%96'lık etanol	2 dk
	%90'lık etanol	2 dk
	%80'lik etanol	2 dk
	%70'lik etanol	2 dk
Yıkama	Musluk suyu	5 dk
	Distile su	5 dk
Boyama	Harris hematoksilen	1 dk 10 sn
Yıkama	Distile su	5 dk
Boyama	Eozin yellow	8dk 30 sn
Yıkama	Distile su	15 sn
Dehidratasyon	%70'lik etanol	20 sn
	%80'lik etanol	15 sn
	%90'lık etanol	15 sn
	%100'lük etanol	15 sn
	%100'lük etanol	15 sn
Şeffaflaştırma	Ksilen	15 sn
	Ksilen	5 dk
	Ksilen	10 dk
Kapama	Entellan	1 saat
		Kapama

3.8.3. Histopatolojik Analiz

Histopatolojik değerlendirme, ışık mikroskobu (Olympus BX51, Olympus Corp., Tokyo, Japonya) altında yapıldı. Bulguların fotoğraflanması için ise Olympus DP71 (Olympus Corp., Tokyo, Japonya) kamera kullanıldı.¹³ Sung ve ark.²²⁷'nin histopatolojik ve tübüler nekroz skorlama yöntemi ile her böbreğin kesitlerinde rastgele seçilen 20 alanda histopatolojik skorlama yapıldı.

3.8.4. Böbreğin İmmunohistokimyasal Analizi

Böbrek doku kesitlerinde apoptotik hücreler kaspaz-3 immün reaktivitesi ile belirlendi. Kaspaz-3 primer antikoru (Rabbit polyclonal, ab4051, Abcam, Birleşik Krallık) ve kaspaz-3 primer antikoru ile uyumlu olarak sekonder antikor (Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP), ab205718, Abcam, Cambridge, Birleşik Krallık) kullanıldı. Parafine gömülmüş olan doku örneklerinden elde edilen 2-3 µm kalınlığındaki kesitlerin dehidratasyon işleminin ardından üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda primer antikor kiti kullanılarak Leica Bond Max sistem (Leica Microsystems, Diegem, Belçika) ile immunohistokimyasal boyama yapıldı (Şekil 3.13). Zıt boyama işleminde ise Harris hematoksilen (Merck, Darmstadt, Almanya) tercih edildi.¹³ Kaspaz-3-pozitif hücre nümerik yoğunlukları, tarafsız hesaplamaların olduğu stereolojik bir teknik olan fraksiyonel yöntem kullanılarak hesaplandı. Tüm gruplarda 20 farklı seçilmiş alanda Mercantepe ve ark.'nın²²⁸ tanımladığı metoda göre ölçümler yapıldı.



Şekil 3.13. İmmunohistokimyasal boyama cihazı

3.8.5. İmmunohistokimyasal Boyama Prosedürü

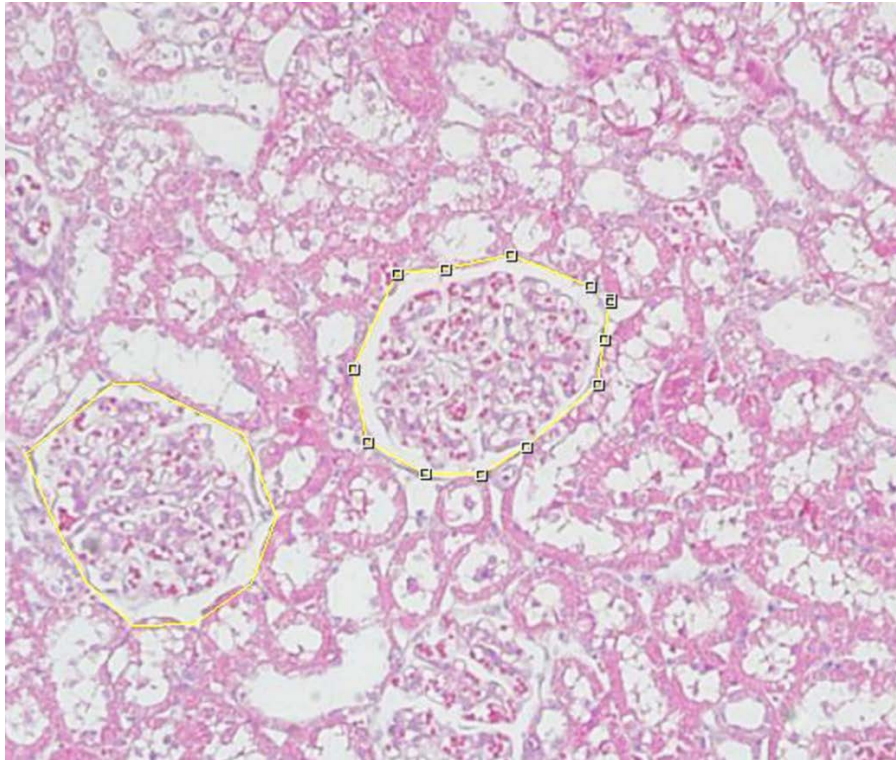
Boyamadan önce böbrekten elde edilen 2-3 μm kalınlığındaki kesitlerin etrafındaki parafin uzaklaştırıldı. Parafin uzaklaştırıldıktan sonra boyama prosedürlerine üretici firmanın önerdiği şekilde devam edildi (Tablo 3.5).

Tablo 3.5. İmmunohistokimyasal boyama prosedürü

Yapılan İşlem	Kullanılan Materyal	Zaman
Deparafinizasyon	60°C'lik etüv	1 saat
	Ksilen	10 dk
	Ksilen	10 dk
Rehidratasyon	%100'lük etanol	5 dk
	%96'lık etanol	5 dk
	%90'lık etanol	5 dk
	%80'lik etanol	5 dk
	%70'lik etanol	5 dk
Yıkama	Distile su	5 dk
Endojen enzim blokajı	%3'lük hidrojen peroksit	10 dk
Yıkama	PBS x 2	
Blokaj	Protein blok solüsyonu	10 dk
Yıkama	PBS	15 sn
Antikor	Primer antikor	1 saat
Yıkama	PBS x 4	
Boyama	Biotilylated Goat anti-polivalent	10 dk
Yıkama	PBS x 4	
Boyama	Steptavidin peroksidaz	10 dk
Yıkama	PBS x 4	
Boyama	DAB kromojen solüsyonu	5-10 dk
Yıkama	PBS	
Boyama	Harris hematoksilen	3 dk
Yıkama	Distile su	
Dehidratasyon	%70'lik etanol	5 dk
	%80'lik etanol	5 dk
	%90'lık etanol	5 dk
	%100'lük etanol	5 dk
	%100'lük etanol	5 dk
Şeffaflaştırma	Ksilen	10 dk
	Ksilen	10 dk
Kapama	Entellan	Kapama

3.8.6. Kantitatif Analiz

Renal korpüskül alan (proksimal ve distal tübül alanları), H&E ile boyanmış böbrek dokusuna ait kesitlerde Olympus DP2-BSW (Olympus Corp., Tokyo, Japonya) programının poliline sondu kullanılarak belirlendi. Ölçümler her bir rata ait preparatta rastgele olarak seçilmiş 10 farklı alanda (her bir grup için 80 alan), x40 büyütme ile çalışma gruplarını bilemeyecek şekilde körleştirilmiş iki histopatolog tarafından yapıldı. (Şekil 3.14)



Şekil 3.14. Renal korus alan (μm^2) ölçümleri

3.9. İstatistiksel Analiz

Q-Q grafiği, Shapiro-Wilk testi, skewness-kurtosis değerleri, ve Levene testine göre tüm veriler normal dağılım gösterdiğinden ve katsayı varyasyonu %20'den az olduğu için, gruplar arası farklılıklar SPSS 25.0 (SPSS, Inc., Chicago, Illinois, ABD) programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ardından Tukey testi ile test edildi. Tüm veriler ortalama \pm standart sapma (SS) olarak ifade edildi. Anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

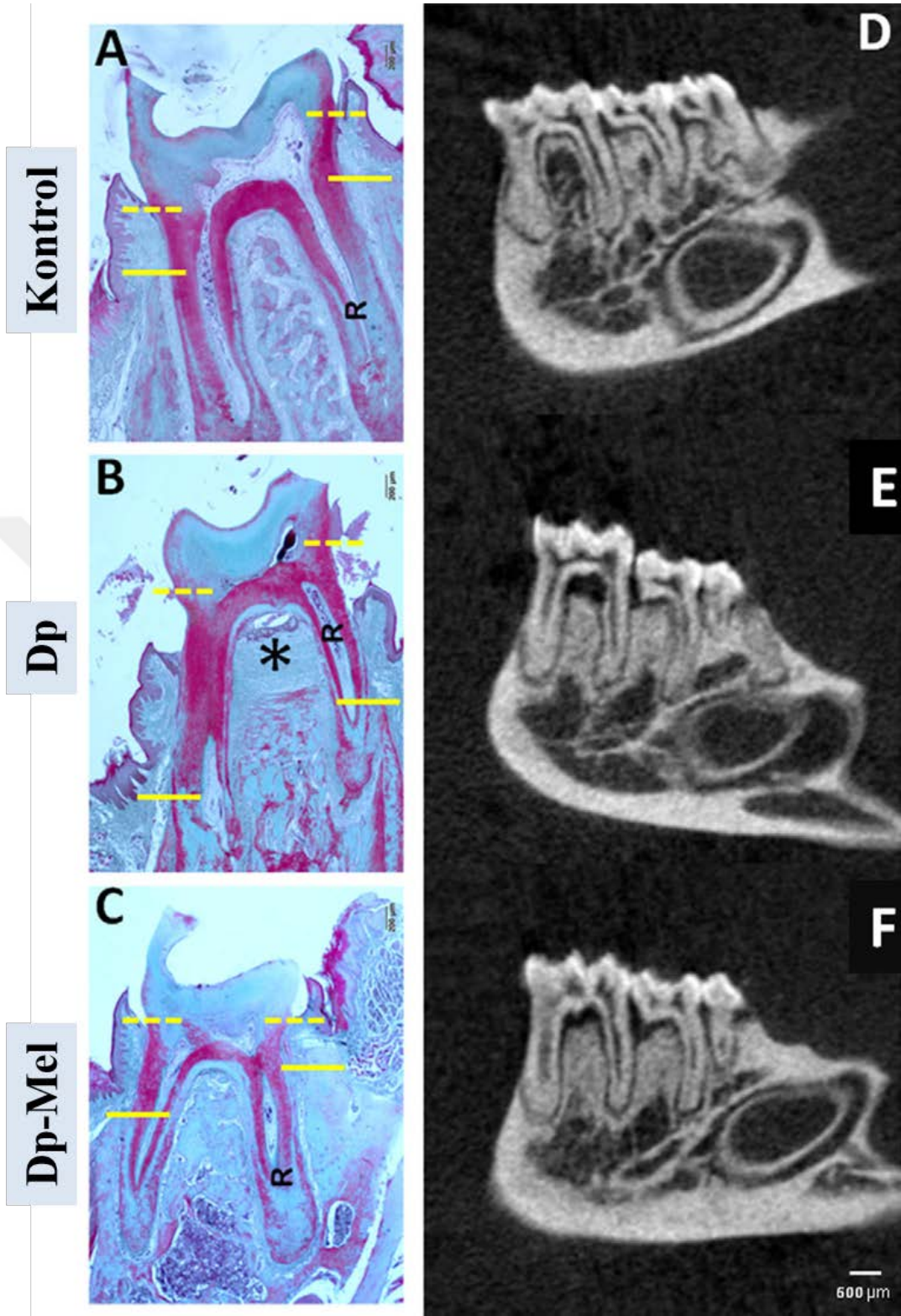
4.1. Morfometrik Bulgular (Alveoler Kemik Kayıpları)

Histolojik kesitler ve mikrobilgisayarlı tomografik kesitler üzerinde yapılan morfometrik ölçüm bulguları gruplar arasındaki değişimler açısından benzerlik göstermektedir. Alveoler kemik kaybı (MSB-KK arası mesafe) kontrol grubuna kıyasla hem Dp ve hem de Dp-Mel gruplarında anlamlı düzeyde daha yüksekti. Dp-Mel grubuyla Dp grubunu kıyasladığımızda ise Dp grubunda alveoler kemik kaybı daha yüksek düzeyde görüldü. Melatonin tedavisi alveoler kemik kaybının tedavisinde etkili olmakla beraber ölçüm bulguları kontrol grubuna kıyasla daha yüksekti ($p < 0.01$). Alveoler kemik kaybı sonuçları ve gruplar arasında karşılaştırılması Şekil 4.1 ve Tablo 4.1’de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Alveoler kemik kayıplarının gruplar arasında karşılaştırılması.

Gruplar	Histomorfometrik analiz	Radyomorfometrik analiz		
	MSB-KK (μm)		MSB-KK (μm)	
Kontrol	B	218 \pm 22,91 ^a	MF	45,34 \pm 4,27 ^a
			DF	40,28 \pm 5,04 ^x
	L	186 \pm 70,06 ^x	D	433 \pm 11,62 ^k
Dp	B	1176 \pm 197,49 ^b	MF	537 \pm 85,51 ^b
			DF	588 \pm 77,81 ^y
	L	951 \pm 148,88 ^y	D	1205 \pm 234,02 ^l
Dp+Mel	B	685 \pm 84,53 ^c	MF	328 \pm 70,06 ^c
			DF	346 \pm 61,66 ^z
	L	598 \pm 70,06 ^z	D	884 \pm 175,74 ^m

Dp; deneysel periodontitis, **Mel**; melatonin, **L**; labial taraf, **B**; bukkal taraf, **MF**; mezial furkasyon, **DF**; distal furkasyon, **D**; distal taraf, **MSB-KK**; mine sement birleşimi-alveolar kemik kreti. Değerler ortalama \pm SS olarak ifade edildi ^{abc, xyz} ve ^{klm} aynı sütundaki dipnot harfler gruplar arasındaki önemli farklılıkları gösterir. Tek yönlü ANOVA ve Tukey testi yapıldı.



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

A, B, C; bucco-lingual kesit, D, E, F; meziyo-distal kesit. R, diş kökü; sarı kesikli çizgi, MSB; sarı çizgi, KK; *, furkasyon lezyon alanı. A, D; kontrol grup kesiti, B, E; Dp grup kesiti, C, F; Dp-Mel grup kesiti

4.2. Biyokimyasal Bulgular

4.2.1. Doku Malondialdehit Düzeyleri

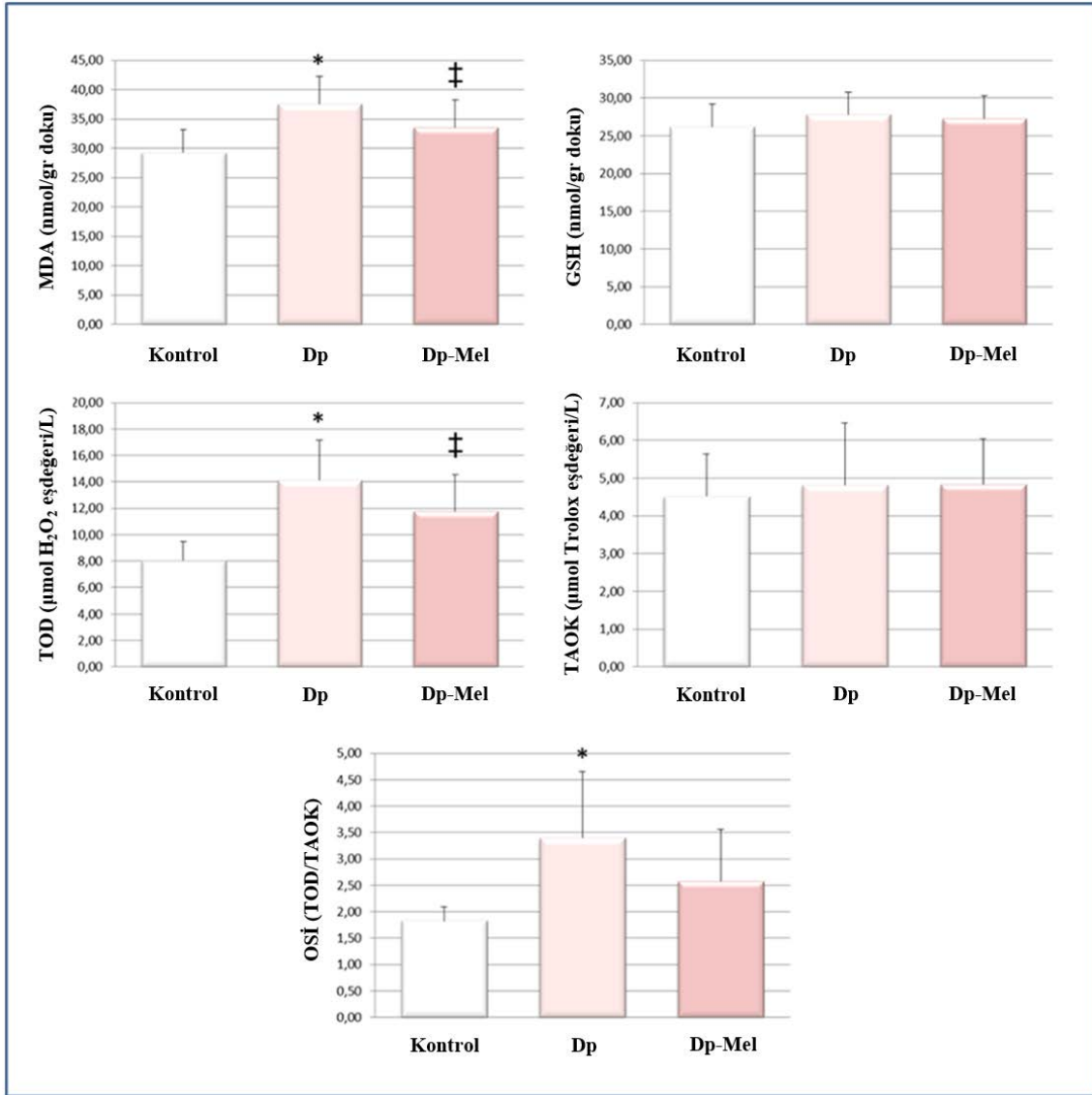
Dokularda yapılan MDA tayini sonucuna göre Dp grubunda MDA düzeyi kontrol grubuna göre belirgin olarak yüksek görüldü ($p>0.05$). Melatonin uygulaması MDA düzeylerinde bir miktar azalma sağlamış ise de Dp-Mel grubunda kontrol grubuna kıyasla hala istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek seyretti ($p<0.05$) (Şekil 4.2).

4.2.2. Doku Glutatyon Düzeyleri

Dokularda yapılan GSH tayini sonucuna göre Dp grubunda GSH düzeyi kontrol grubuna göre hafifçe daha yüksek olduğu görüldü. ($p>0.05$) Melatonin uygulaması antioksidan bir parametre olan GSH'ın böbrek düzeylerinde kontrol grubuna göre hafif bir artış sağladı ($p>0.05$) (Şekil 4.2).

4.2.3. Doku TAOK, TOD ve OSİ Düzeyleri

Doku TOD ve OSİ düzeylerinin Dp grubunda kontrol grubuna göre belirgin bir artış ($p<0.05$) gösterdiği, TAOK düzeylerinin ise hafifçe daha yüksek ($p>0.05$) olduğu görüldü. Melatonin uygulaması periodontitis ilişkili oksidatif stresi belirgin olarak baskılamış ise de, ($p<0.05$) TOD ve OSİ düzeyleri Dp-Mel grubunda kontrol grubuna kıyasla hala istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek görüldü. ($p<0.05$) Melatonin, antioksidan bir parametre olan TAOK'un böbrek düzeylerinde ise hafif bir artış sağladı ($p>0.05$) (Şekil 4.2).



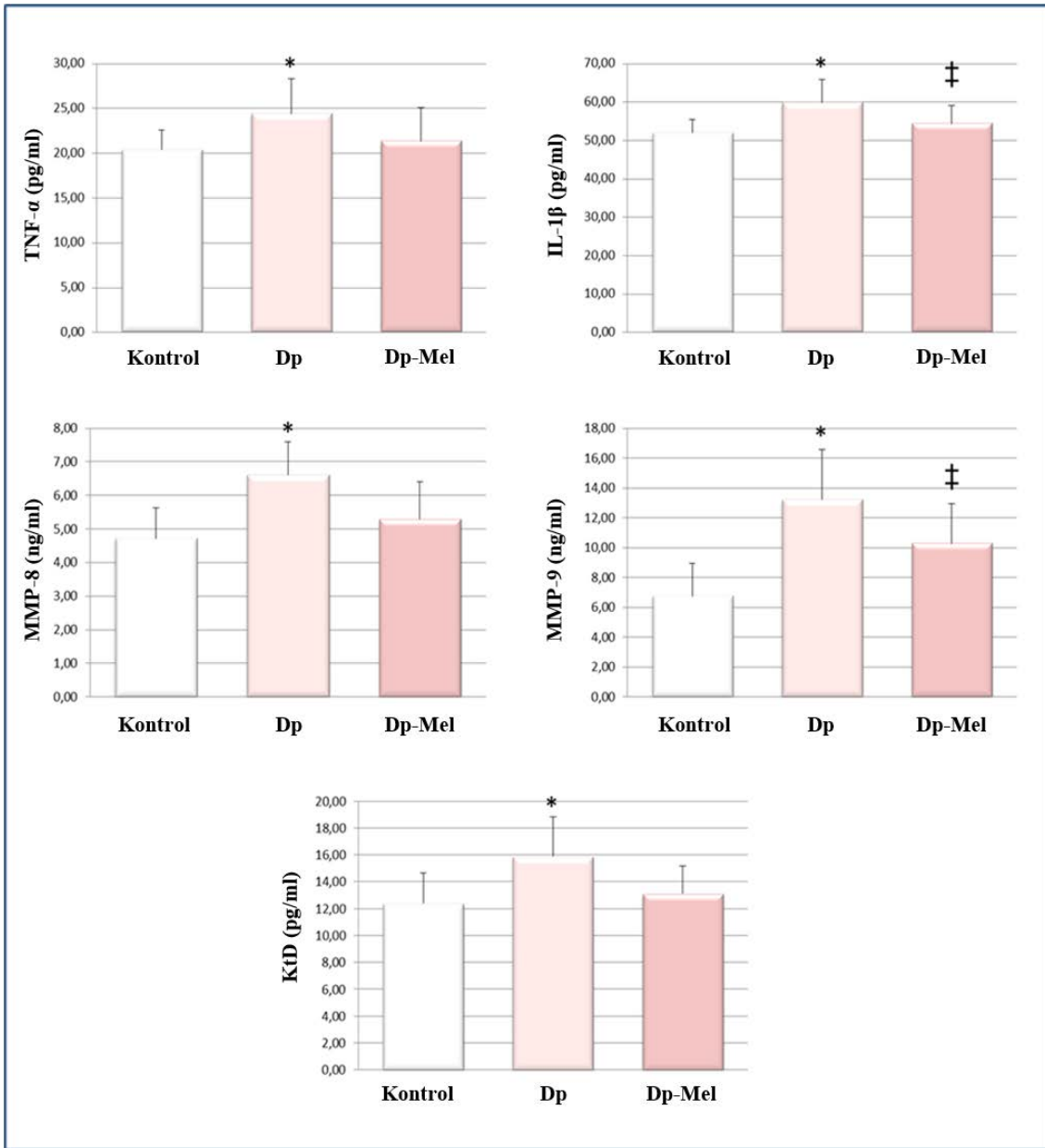
Şekil 4.2. Böbrek dokusu oksidatif stres parametrelerinin gruplar arasında karşılaştırılması

Dp, deneysel periodontitis; Mel, melatonin; MDA, malondialdehit; GSH, glutatyon; TOD, total oksidan durum; TAOK, total antioksidan kapasite; OSİ, oksidatif stres index. Sonuçlar ortalama \pm SS olarak ifade edildi. Semboller (*, ‡) gruplar arasında önemli farklılıklar olduğunu göstermektedir. Tek yönlü ANOVA ve Tukey testi yapıldı ($P < 0.05$).

4.2.4. Doku Proinflamatuvar Sitokin ve Enzim Seviyeleri

Bu çalışmada incelenen tüm sitokin (TNF- α ve IL-1 β) ve proteazların (MMP-8, MMP-9 ve KtD) böbrek dokusu düzeyleri periodontitisli ratlarda kontrol grubuna kıyasla daha yüksekti ($p < 0.05$). Melatonin uygulaması tüm bu parametrelerin böbrek düzeylerinde belirgin bir düşüş sağlamış ise de ($p < 0.05$), IL-1 β ve MMP-9 düzeyleri Dp-Mel grubunda kontrol grubuna kıyasla hala istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha

yüksekti ($p < 0.05$). TNF- α , MMP-8 ve KtD düzeylerinde Dp-Mel ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($p > 0.05$) (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. İnflamatuar parametrelerin gruplar arasında karşılaştırılması

Dp, deneysel periodontitis; Mel, melatonin; TNF- α , tümör nekroz faktör- α ; IL-1 β , interlökin-1 β ; MMP-8, matrix metalloproteinaz-8; MMP-9, matrix metalloproteinaz-9; KtD, katepsin D. Sonuçlar ortalama \pm SS olarak ifade edildi. Semboller (*, ‡) gruplar arasında önemli farklılıklar olduğunu göstermektedir. Tek yönlü ANOVA ve Tukey testi yapıldı ($P < 0.05$).

4.3. Böbrek Fonksiyon Parametreleri

İncelenen tüm fonksiyonel parametrelerden (kreatinin, üre, sistatin C) özellikle serum sistatin C ve üre kreatinin düzeyleri kontrol grubuna kıyasla periodontitisli ratlarda

istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir düzeyde daha yüksek tespit edildi ($p>0.05$). Bununla birlikte, melatonin tedavisi periodontitis ilişkili söz konusu artışları kontrol grubu düzeylerine geriletebildi ($p>0.05$). Böbrek fonksiyon parametrelerinin sonuçları ve gruplar arasında karşılaştırılması Tablo 4.2’de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Böbrek fonksiyon parametrelerinin gruplar arasında karşılaştırılması.

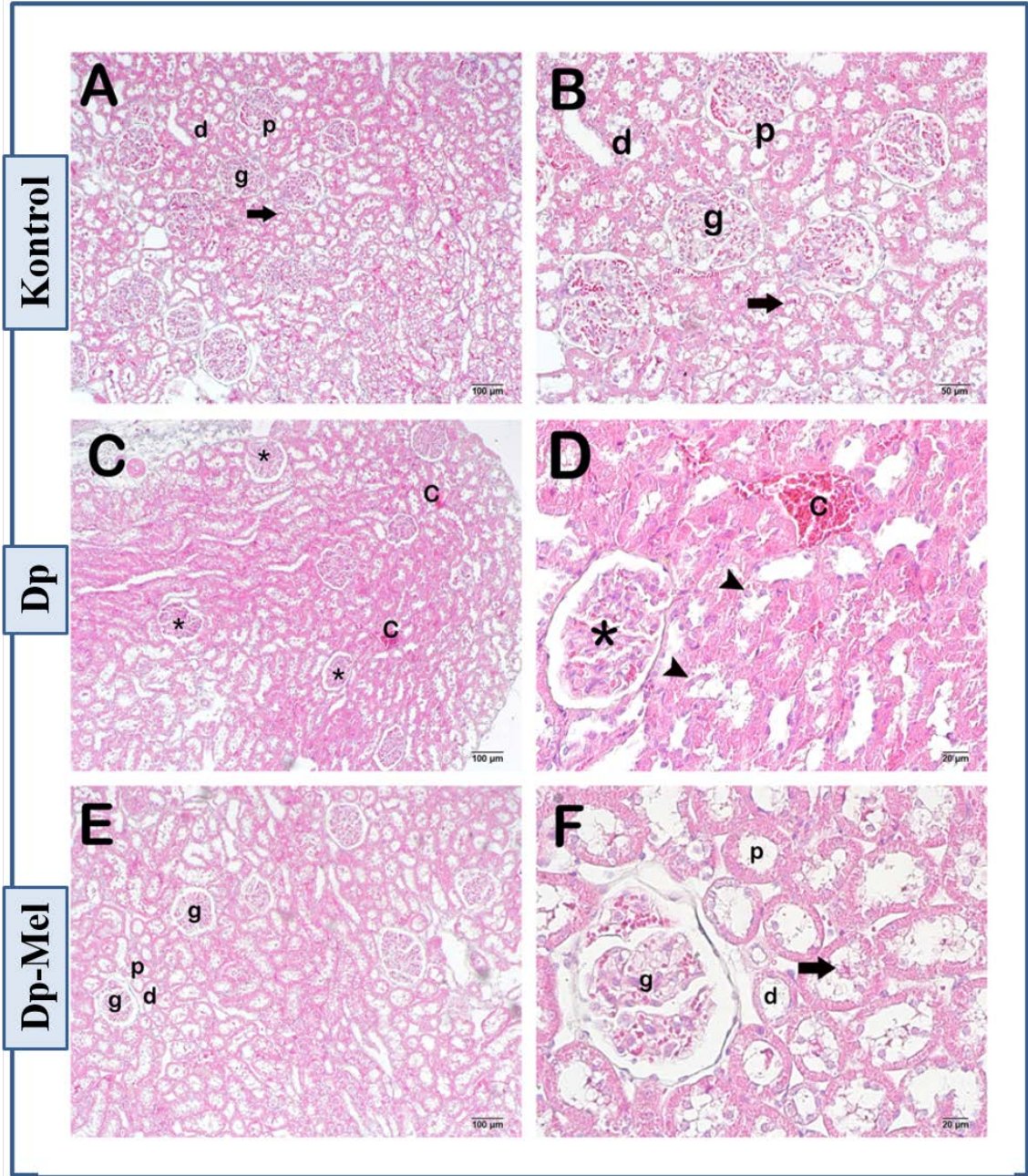
Parametreler	Kontrol	Dp	Dp+Mel
Üre (serum: mg/dL)	41,33 ± 6,65	41,63 ± 3,88	38,67 ± 1,86
Kreatinin (serum: mg/dL)	1,18 ± 0,25	1,33 ± 0,25	1,17 ± 0,25
Sistatin C (serum: mg/L)	0,26 ± 0,51	0,29 ± 0,54	0,27 ± 0,45
Kreatinin (Üre: mg/dL)	84,24 ± 10,27	89,12 ± 19,54	82,14 ± 13,55

Dp; deneysel periodontitis, **Mel**; melatonin. Sonuçlar ortalama ± SS olarak ifade edildi.^{ab} Aynı satırdaki farklı harfler gruplar arasında önemli farklılıklar olduğunu göstermektedir. Tek yönlü ANOVA ve Tukey testi yapıldı ($P < 0.05$).

4.4. Histopatolojik Bulgular

4.4.1. Işık Mikroskobu Bulguları

Histopatolojik incelemelerde kontrol grubundaki ratlara ait kesitlerde böbrek dokusunda normal yapıda glomerul, proksimal ve distal tübüller tespit edildi. Özellikle proksimal tübüllerdeki fırçamsı kenar belirgin olarak gözlenmekteydi (Şekil 4.4.A-B). Dp grubundaki ratlarda ise Bowman kapsülünde şişme ve tübüller nekrozis gözlemlendi. Bununla birlikte proksimal ve distal tübüllerde dejenerasyon ve peritübüler alanlarda kapiller tıkanıklık tespit edildi (Şekil 4.4.C-D). Diğer yandan, Dp-Mel grubundaki ratlarda Bowman kapsülleri ile proksimal ve distal tübüller düzenli morfolojiler sergiledi. Glomerüller dejenerasyon ve tübüller epitelyal hücre hasarı düzeyleri periodontitisli ratlardan daha düşüktü (Şekil 4.4.E-F).



Şekil 4.4. Böbrek dokusunun ışık mikroskobu görüntüsü

H&E boyama. A(x10)-B(20): Normal glomerüler yapı, belirgin fırça kenarları olan proksimal ve distal tübüller gözlemlendi. C(x10)- D(x20): Glomerül şişmesi, tübül nekroz ve vasküler tıkanıklık gözlemlendi. E(x10)-F(x20): Glomerül, proksimal ve distal tübüllerin tipik yapısı gözlenmiştir. Proksimal tübüllerin epitel hücrelerinde fırça kenarlarının tipik yapısı görülmüştür. Dp, deneysel periodontitis; Mel, melatonin; p, proksimal tübül; d, distal tübül; g, glomerül; ok, fırça kenarı; ok başı, tübül nekroz; C, tıkalı alan; *, atipik glomerül. A,B; Kontrol grubu kesiti, C,D; Dp grubu kesiti, E,F; Dp-Mel grubu kesiti

4.4.2. İmmunohistokimyasal Bulgular

Periodontitisli ratların böbrek kesitlerinde, proksimal ve distal tübül epiteldeki kaspaz-3 pozitif hücre yoğunluğu kontrol grubuna kıyasla belirgin olarak daha fazla gözlemlendi ($p < 0.01$) (Şekil 4.5.A-D; Tablo 4.3). Melatonin tedavisi apoptotik hücre

yoğunluğunda belirgin bir azalma sağlamış ise de ($p<0.05$), kaspaz-3 boyama melatoninle tedavi edilen rat grubunda kontrol grubuna kıyasla hala istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksekti ($p<0.05$) (Şekil 4.5.C-F; Tablo 4.3).

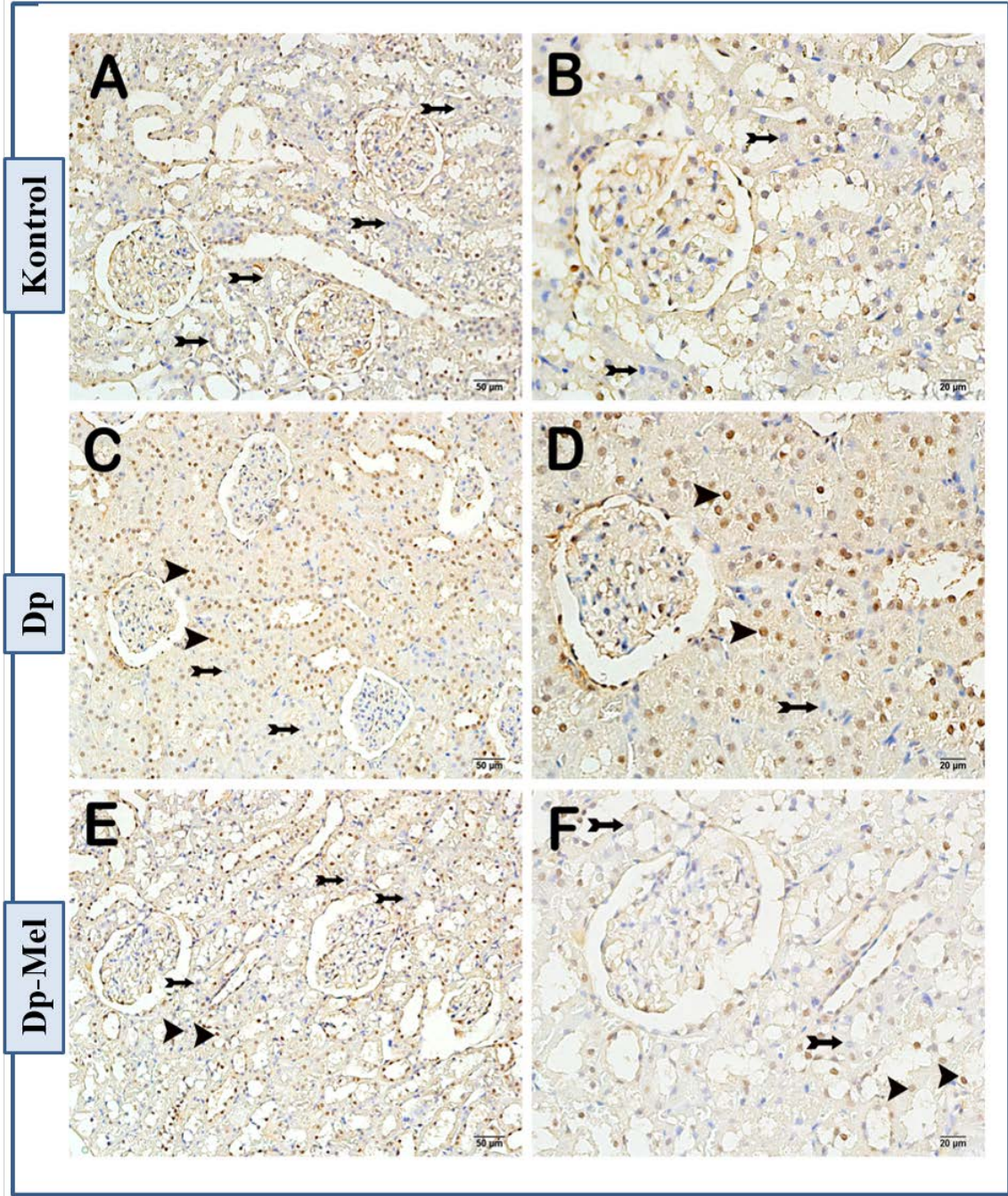
Tablo 4.3. Kaspaz-3 pozitif nümerik yoğunluk ve renal korpüskül alan ölçümleri

Ölçümler	Kontrol	Dp	Dp + Mel
Kaspaz-3 pozitif nümerik yoğunluk (mm^3)	$3,13 \pm 0,41^a$	$15,09 \pm 3,22^b$	$6,84 \pm 1,98^c$
Renal korpüskül alan (μm^2)	$4532,16 \pm 313,77^a$	$7490,25 \pm 2195,45^b$	$6292,64 \pm 1528,20^c$

Dp; deneysel periodontitis, **Mel;** melatonin. Sonuçlar ortalama \pm SS olarak ifade edildi. ^{ab} Aynı satırdaki farklı harfler gruplar arasında önemli farklılıklar olduğunu gösterir. Tek yönlü ANOVA ve Tukey testi yapıldı ($P<0.05$).

4.4.3. Semi-kantitatif Analiz Bulguları

Periodontitis grubunda renal korpüskül alanın kontrol grubuna kıyasla belirgin olarak artmış olduğu gözlemlendi ($p < 0.01$) (Şekil 4.4.A-D; Tablo 4.3). Diğer yandan, melatonin uygulaması renal korpüskül alanda azalma sağlamış ise de ($p<0.05$) (Şekil 4.4.A-F; Tablo 4.3), kontrol grubuna kıyasla hala istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksekti ($p<0.05$) (Şekil 4.4.A-F; Tablo 4.3).



Şekil 4.5. Böbrek doku kesitlerindeki apoptotik değişikliklerin ışık mikroskopunda görünümü

Anti-Kaspaz-3. A(x20)- B(x40): Tübüler epitel hücrelerinin normal yapısının görünümü. C(x20)-D(x40): Dp grubu böbrek doku kesitlerinde apoptotik epitelyal tübül hücreleri gösterilmiştir. E(x20)-F(x40): Dp + Mel grubu tipik tübüler epitel hücresi ve hafif apoptotik tübüler epitel hücrelerini göstermiştir. Dp, deneysel periodontitis; Mel, melatonin; kuyruklu ok, normal epitel tübül hücreleri; ok başı, apoptotik epitelyal tübül hücreleri. A, B; Kontrol grup kesiti, C, D; Dp grup kesiti, E, F; Dp-Mel grup kesiti.

5. TARTIŞMA

Hayvan çalışmaları; bilginin klinik ortama aktarılabilmesi, sebep-sonuç ilişkilerinin kurulması ve verilerin daha doğru yorumlanması açısından kritik öneme sahiptir.²²⁹ Bazı çalışmalar *in vitro* sistemler kullanılarak gerçekleştirilebilse de, insanlara transfer edilmeden önce elde edilen verilerin güvenliğinin ve etkinliğinin test edilmesi için hayvan modellerine ihtiyaç vardır. Fare veya rat gibi küçük hayvan modelleri, inflamasyon sırasında yumuşak ve sert doku arasındaki etkileşimler hakkında önemli veriler sağlayabilmektedir. Bununla birlikte, sistemik inflamasyonun potansiyel mekanizmaları ve bunun periodontal iyileşme süreci üzerindeki etkisi *in vivo* olarak incelenebilmektedir.²³⁰

Literatürde denek olarak erkek hayvanların dişilere göre daha çok tercih edildiği raporlanmıştır.^{231, 232} Dişi farelerin östrojen döngüsü sırasında hormon seviyelerinde değişiklikler gözlenmektedir.²³³ Bu hormonların gen ekspresyonu ve fenotip üzerinde güçlü etkileri olabilmektedir.²³⁴⁻²³⁶

Ratlar, periodontal hastalıkların patogenezi için en yaygın çalışılan hayvanlardır ve deneysel çalışmalarda molar diş bölgelerinin periodontal yapısının insana benzerlik göstermesi, maliyetlerinin uygun olması, temin edilebilirliğinin, beslenmelerinin ve üretilmelerinin kolay olması nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte oluşturulan deneysel periodontal hastalığın histopatolojik ve klinik bulgularının insanlara oldukça benzer olduğu rapor edilmiştir. En sık kullanılan rat tipleri Wistar Albino ve Spraque-Dawley'dir.²³⁷⁻²³⁹

Ratlarda inflamasyonu indükleyerek deneysel periodontal hastalık oluşturmak için iki teknik yaygın olarak kullanılmaktadır. Birinci yöntem, bakteriler ve/veya bakteriyel virülans faktörlerinin (örneğin; LPS) bölgeye enjekte edilerek akut bir periodontal

patoloji oluşturulmasıdır. Bu yöntem hızlıca hastalık geliştirme avantajına sahiptir; fakat bakterilerin endotoksinine karşı akut inflamatuvar yanıtın verilmesi, enfeksiyonun bakteriler tarafından oluşturulmaması yöntemin dezavantajlarıdır.²²⁹ İkinci yöntem ise mikroorganizmaların kolonizasyonuna izin veren ligatürlerin dişlerin etrafına yerleştirilmesidir. Böylelikle dentogingival bölgede mekanik travmaya, dental plağa karşı gelişen konak yanıtının yoğun olmasına ve doku bütünlüğünün bozulmasına imkan tanımaktadır.²⁴⁰ Plak birikimi sulkular epitelin ülserasyonuna yol açarak ve bağ dokunun invazyonunu kolaylaştırarak insanlardaki gibi periodontal doku harabiyetini başlatmaktadır. Bu deneysel hayvan modeli doğal plak oluşumuna en yakın model olarak kabul edilmektedir.²²⁹

Sunulan çalışma ligatürle indüklenen periodontitisin rat böbreklerinde inflamatuvar-oksidatif stres ilişkili biyokimyasal değişiklikler yanı sıra belirgin yapısal bozulmalara da neden olduğunu, apoptozisi indüklediğini, buna karşın böbrek fonksiyonel durumunda ise belirgin bir değişikliğe neden olmadığını gösterdi. Bunun yanı sıra, sistemik melatonin tedavisinin böbreklerdeki inflamasyonu ve patolojik değişiklikleri belirgin olarak sınırladığı, fonksiyonel kapasiteyi ise desteklediği tespit edildi. Bilgilerimize göre çalışmamız periodontitis ilişkili böbrek hasarı üzerine melatoninin terapötik etkinliğini biyokimyasal, histopatolojik ve immünohistokimyasal olarak kapsamlı bir şekilde inceleyen ilk çalışma olma özelliğindedir. Her ne kadar periodontitisin böbrek dokusu üzerine etkilerini açıklayan biyolojik mekanizmalar henüz tam olarak ortaya konamamış ise de, 2 muhtemel mekanizma üzerinde yoğunlaşmıştır: 1) kan dolaşımına katılarak böbrek dokusuna ulaşan periodontal bakteriler veya onların virülans faktörleri^{6, 7, 241} ve 2) periodontitis odaklarındaki inflamatuvar infiltrattan sistemik dolaşıma katılarak böbreklere ulaşan proinflamatuvar etkili çeşitli sitokin ve mediyatörler.^{8, 138, 242} Sonuçta böbrek dokusunda immun sistem aktive edilmekte ve

nötrofiller, makrofajlar, lenfositler ve NK hücrelerden çeşitli inflamatuvar mediyatörler ve ROT yoğun olarak salınmaktadır. Düşük düzeyde ROT salınımı, hücre farklılaşması, büyümesi, apoptoz, immunité ve mikroorganizmalara karşı savunma gibi pek çok biyokimyasal süreçlerde gereklidir;²⁴³ fakat aşırı salınması antioksidan mekanizmalar tarafından kontrol edilemediğinde, dokuda oksidatif stres olarak adlandırılan inflamatuvar bir durum ortaya çıkmaktadır. Oksidatif stres doku homeostazı ve hücrel fonksiyonlar açısından hayati öneme sahip membran lipidleri, proteinleri ve DNA gibi biyomoleküllerde önemli hasarlara neden olmaktadır.²

Sunulan hayvan çalışmasında böbrek dokusundaki oksidatif durumu incelediğimiz belirteçler MDA, GSH ve OSİ idi. MDA, bir oksidatif hücre membran hasarı belirteçidir, en sıklıkla yararlanılan oksidatif stres belirteçlerinden birisi olup membran fosfolipitlerindeki oksidatif hasar düzeyi hakkında bilgi vermektedir. MDA oluştuktan sonra kolayca diffüze olup membran yapısındaki lipid ve proteinlere çapraz bağlanarak membran bütünlüğünü bozar, bu da membran permeabilitesinin bozulmasına neden olur. Değişik organ sistemleri üzerinde İ/R modeli oluşturularak yapılan birçok çalışmada MDA düzeyinin yükseldiği gösterilmiştir.^{244, 245} GSH ise temel hücre içi antioksidan olarak kabul edilmektedir. Hücrel oksidatif hasarın inhibisyonunda önemli bir role sahiptir.⁹⁶ Oksidatif stres düzeyinin değerlendirilmesinde MDA ve 8-hidroksideoksi-guanozin (8-OHdG) gibi spesifik oksidatif yıkım ürünleri değerli bilgiler sağlıyor ise de dokudaki nihai oksidatif durumu yansıtmakta ne yazık ki yetersiz kalmaktadır. Benzer şekilde, belli enzimatik veya non enzimatik antioksidan düzeylerine yönelik ölçümler de total antioksidan etkinliği net olarak yansıtamamaktadır. Güncel çalışmalar TOD ve TAOK ölçümlerinin nihai oksidatif ve antioksidan durumları daha açık bir şekilde ortaya koyduğunu rapor etmektedirler. Dahası, pratik ve güvenilir bir yöntem olan TAOK'un, bilindik antioksidanların yanı sıra henüz keşfedilmemiş antioksidanların etkilerini de

yansıttığı bildirilmektedir. OSİ, TOD ile TAOK arasındaki oransal bir değerdir ve oldukça geçerli bir parametredir. Oksidatif stres düzeyini daha net ve pratik bir şekilde ortaya koymak amacı ile Erel⁸² tarafından önerilmiştir. Hem ROT üretimi hem de antioksidan durumdan direkt olarak etkilenmektedir.⁸²

Hagar ve ark.²⁴⁶ sağ böbrekte nefroktomi ve sol böbrekte İ/R indüksiyonu yaptıkları deneysel modelde böbrek MDA konsantrasyonunun arttığını ve böbrek GSH içeriğinin azaldığını bildirmişlerdir. Korkmaz ve ark.²⁴⁷ İ/R indüksiyonu yaptıkları benzer bir çalışmada da MDA düzeylerinin arttığı, GSH düzeylerinde anlamlı bir azalma gözlemlediklerini rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise periodontitise bağlı oluşturulan böbrek hasarında kontrol grubuna kıyasla Dp grubunda MDA düzeylerinin belirgin olarak artışı ve GSH düzeylerinin ise hafifçe daha yüksek olduğu görülmüştür.

Periodontitisli ratlarda böbrek MDA ve OSİ düzeylerinin arttığını, GSH ve TAOK düzeylerinde ise anlamlı bir değişiklik olmadığını gösteren bulgularımız Franca ve ark.⁸ ile de kısmen uyumlu olup, periodontitisin renal yapılarda oksidatif hasarı stimüle edebildiğini göstermektedir. Franca ve ark.'nın 20 günlük ligatür uygulaması sonucunda hem böbrek⁸ ve hem de hepatic dokuda²⁴² GSH düzeylerinde anlamlı düşüşler rapor etmişlerdir. Periodontitis gelişimini 35 günlük ligatür uygulaması ile indüklediğimiz bu çalışmada, antioksidan parametreler olan GSH ve TAOK düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla periodontitisli ratlarda hafifçe arttığını tespit ettik. GSH düzeylerinde tespit ettiğimiz hafif artış, böbreklerde periodontitis ilişkili erken dönem inflamatuvar yanıtın tetiklediği aşırı ROT üretimine karşı antioksidan sistemin adaptif cevabı ile ilişkili olabilir.

Destekler şeklinde, Tomofuji ve ark.¹³⁸ böbreklerdeki oksidatif DNA hasarının (8-OHdG seviyesi) periodontitisli ratlarda yaklaşık 2 kat arttığını rapor etmişlerdir. Bunun yanı sıra, ligatürle indüklenen periodontitisli ratlarda Vancoscelos ve ark.²⁴² hepatic

dokuda, Köse ve ark. ise sol ventriküler kalp dokusunda^{166, 223} hücre membranlarındaki oksidatif hasarın (MDA düzeyindeki artış) arttığını göstermişlerdir. Aşırı ROT üretimini ve sonuçta da oksidatif stresi provoke eden muhtemel mekanizmalardan birisi olarak böbrek dokusu TNF- α ve IL-1 β düzeylerinde tespit ettiğimiz anlamlı artışlar gösterilebilir.²⁴⁸

Periodontitisle kronik böbrek hastalığı arasındaki mekanizma sistemik inflamasyonla ilişkilidir. Periodontitisin aktif olduğu durumda, IL-6 ve TNF- α gibi lokal olarak üretilen inflamatuvar sitokinler, KBH'nin ilerlemesine neden olan C-reaktif protein (CRP) seviyelerini yükselterek sistemik olarak etki etmektedir.¹³³

Bu çalışmada ayrıca periodontitisin, bir lizozomal aspartat proteaz olan katepsin D ve çinkoya bağımlı birer endopeptidaz olan MMP-8 ve MMP-9'un böbrek düzeyleri üzerine etkilerini de inceledik. MMP'ler renal doku hasarı ve fibroziste rol alan temel proteinazlardır. MMP'lerin salınımı ve aktivitesindeki değişimler intrarenal extraselüler matrix kompozisyonunu belirlemektedir. Mezenjyal matris ve glomerüler bazal membran, matris oluşumu ve bozunması ile düzenlenir; ve ana bileşenleri MMP-2 ve MMP-9 jelatinazlarının ana substratı olan tip IV kollajendir.²⁴⁹ MMP'lerin sadece matriks yıkımıyla ilişkili olmadığı, enflamasyon, epitelyal-mezenkimal geçiş, hücre proliferasyonu, anjiyogenez ve apoptozun düzenlenmesi dahil çok çeşitli rolleri üstlendiği gösterilmiştir.²⁵⁰ Akut böbrek hasarı,^{251, 252} diabetik nefropati,^{253, 254} glomerülonefrit,²⁵⁵ kalıtsal böbrek hastalığı²⁵⁶ ve kronik allogreft nefropatisi^{257, 258} dahil birçok böbrek hastalığında değişen MMP düzeyleri için sağlam kanıtlar mevcuttur. Akut böbrek hasarında idrar biyobelirteci olarak MMP-9'a bakılırken diabetik nefropatide serum ve idrarda MMP-2, MMP-8 ve MMP-9 da artış görülmüştür.²⁵⁰ MMP'lerin renal inflamasyondaki rolleri ise TIMP'ler ile birlikte, inflamatuvar hücre aktivasyonu ve sitokin salınımı ile hücre kemotaksis, proliferasyon ve apoptozisin düzenlenmesidir.²⁵⁰

MMP'lerin yanı sıra Kt'lerin de, özellikle de KtD, böbrek hastalıklarının başlangıcı ve ilerlemesinde önemli bir role sahip olduğu gösterilmiştir.^{126, 259} Esas olarak lizozomlarda lokalize olan Kt'ler belirli koşullar altında hücre içi ve hücre dışı alanlarda da bulunabilir. KtD'nin lizozomdan sitozole sızmasıyla apoptozu indüklediği bilinmektedir.¹²⁶ ABH'de KtD'nin hücre ölümüne olası katkısını düşündüren hasarlı tübüler hücrelerde yüksek oranda eksprese edilmiştir.²⁶⁰ Apoptoz sırasında lizozomal membran geçirgenliği, KtD'nin lizozomdan proapoptotik işlevini uygulayabileceği sitozole translokasyonuna izin verir. Sitozolik KtD, mitokondriyal apoptozis düzenleyici bir protein olan Bax'ın (Bcl-2 ile ilişkili x proteini) mitokondriyal membrana eklenmesini tetikler ve böylece mitokondriden sitozole sitokrom c salınımına ve prokaspaz 9 ve 3'ün aktivasyonuna yol açar.¹²⁶

KBH'deki KtD aktivite artışı renal hücre dışı matriks hasarı²⁵⁹ yanı sıra inflamasyon^{126, 259}, endotelial disfonksiyon²⁶¹ ve podositlerin (Bowman kapsülü epitelyum hücreleri) apoptotik ölümüyle²⁶² de ilişkili bulunmuştur. Dp grubunda tüm bu enzimlerin böbrek düzeylerinde tespit ettiğimiz belirgin artışlar dokudaki periodontitis ilişkili inflamatuvar değişikliklerin bir sonucu olabilir. Çalışmalar TNF- α , IL-1 β ^{263, 264} ve oksidatif stresin²⁶⁴ MMP-9 salınımını ve proMMP-9 aktivasyonunu stimüle ettiğini göstermiştir. Bu bağlamda, periodontitisin özellikle MMP-9 ve KtD düzeylerinde neden olduğu belirgin artış böbreklerde tespit ettiğimiz histopatolojik değişiklikler ve kaspaz-3 aktivite artışına katkı sağlayan mekanizmalardan birisi olabilir.

Histopatolojik incelememizde periodontitisli ratların böbreklerinde renal tübüllerin fırçamsı kenarlarında bozulmalar, glomerüllerde şişme, tübüler nekrozis, peritübüler kapiller konjesyon ve renal korpüskül alanda artış tespit ettik. Destekler şekilde, Franca ve ark.'da⁸ ligatürle indüklenen periodontitisin böbreklerde benzer yapısal değişikliklere neden olduğunu göstermişlerdir. Söz konusu değerli çalışmada renal

korpusköl alanın yanı sıra glomerül çapının ve hacminin de periodontitisli ratlarda arttığı gösterilmiştir. Bulgularımız genel olarak değerlendirildiğinde böbreklerde tespit edilen hücresel ve hücre dışı hasarlar proinflamatuvar sitokinler (TNF- α , IL-1 β) ve oksidatif stres tarafından direkt olarak veya dolaylı yollarla provoke edilen inflamatuvar cevaplar ve enzimatik aktivitedeki artışın bir sonucu olabilir. Buna karşın, bizden farklı olarak periodontal yıkımın LPS uygulanması ile indüklenen başka bir hayvan çalışmasında ise histopatolojik olarak belirgin bir dejenerasyon tespit edilmemiştir.^{9, 10} Bu durumun muhtemel nedenlerinden birisi söz konusu çalışmalardaki periodontitis indüklenme süresinin (10 gün) oldukça kısa olmasıdır. Bu sebeple böbreklerdeki periodontitis ilişkili yapısal dejeneratif etkiler yeterince ortaya çıkamamış olabilir.

Bu deneysel çalışmada biz ayrıca periodontitisin böbreklerdeki muhtemel apoptotik etkilerini kaspaz-3 boyamaları ile inceledik. Kaspaz-3 aktivasyonu, hücre ölümünden önce geri dönüşü olmayan son durum olarak kabul edilir ve apoptoz belirteci olarak kullanılır.¹³ Bilgilerimize göre çalışmamız periodontal enfeksiyonun böbreklerdeki apoptotik etkilerini inceleyen ilk hayvan çalışmasıdır. Bu sebeple kontrollere kıyasla periodontitisli ratlarda tespit ettiğimiz belirgin apoptotik değişiklikleri direkt olarak kıyaslayabileceğimiz bir literatür yoktur. Ancak periodontitis ile çok benzer sistemik inflamatuvar etkilerle karakterize hastalıklar olan DM^{14, 265} ve obezitenin²⁶⁶ renal tübüler epitelyal hücrelerde belirgin apoptotik değişikliklere neden olduğu hayvan modellerinde açıkça gösterilmiştir. Giribabu ve ark.¹⁴ streptozotosin-nikotinamidle indüklenen diabetik ratlarda kaspaz-3'ün yanı sıra Bax'ın ve kaspaz-9 aktivitelerinin de arttığını rapor etmişleridir. Hiperglisemi, inflamasyon ve oksidatif stres kaspaz-3 ve kaspaz-9'un da dahil olduğu apoptoz sinyal yolunu aktive eden Bax'ın böbreklerdeki üretimini tetikleyebilmektedir.²⁶⁷ Bu bağlamda, periodontitisli ratların böbreklerinde tespit ettiğimiz inflamatuvar durum ve oksidatif stres artışı beraber değerlendirildiğinde

apoptotik değişikliklerin indüklendiği düşünülebilir. Bunun yanı sıra MMP'ler, özellikle MMP-9, aktivitesindeki artışında böbreklerde apoptotik değişiklikleri provoke ettiği gösterilmiştir.²⁴⁹

İlginç bir şekilde, böbrek dokusunda tespit ettiğimiz yukarda tartışılan inflamatuvar stres ve histopatolojik ve immünohistokimyasal dejenerasyonlara rağmen fonksiyonel parametrelerde (serum üre, kreatinin ve sistatin C seviyeleri ile üre kreatinin) kontrol ratlarına kıyasla belirgin bir değişiklik tespit edemedik. Periodontitisin böbrek fonksiyonları üzerine etkilerini inceleyen diğer deneysel çalışmalarda^{8-10, 268} da benzer bulgular ortaya konmuştur. Buna karşın, pankreas hasarı yoluyla deneysel olarak diabet oluşturulan ratlarda Giribabu ve ark.¹⁴ 4 hafta, Ebaid ve ark.²⁶⁹ ise 6 hafta sonunda böbrek fonksiyonel parametrelerde belirgin bozulmalar rapor etmişlerdir. Bu bulgular periodontitisin renal dokuda oluşturduğu fonksiyonel hasarın diabetinkine kıyasla daha sınırlı olduğunu göstermektedir. Bu bağlamda daha uzun dönemli periodontitis modellerinde, yapısal hasarların yanı sıra fonksiyon bozukluklarının da ortaya çıkabileceği düşünülebilir. Buna karşın, güncel sistematik derlemeler periodontitisin serum kreatinin düzeyi ve GFH gibi böbrek fonksiyon parametrelerinde artışa neden olduğunu rapor etmişlerdir.^{6, 11} Deneysel çalışmalar ve insan çalışmaları arasındaki bu çelişki böbreklerin periodontitis kaynaklı inflamatuvar strese maruz kalma süreleri arasındaki farklılığın bir sonucu olabilir.

Melatoninin, çeşitli sistemik inflamatuvar hastalıklara bağlı olarak ortaya çıkan yapısal ve fonksiyonel böbrek hasarları üzerine koruyucu etkileri, hayvan modellerinde yoğun olarak araştırılan güncel bir konudur.^{24, 265} Buna karşın periodontitis ilişkili böbrek hasarında melatoninin rolüne yönelik çok sınırlı kanıta sahibiz: Gulle ve ark¹⁰ 10 günlük bir LPS ile indüklenen periodontitis modelinde böbrek dokusunda histopatolojik olarak belirgin bir farklılık tespit edememişlerdir. Dolayısıyla deney süresi boyunca günlük 50

mg/kg dozunda uygulanan melatoninin yapısal bozukluklar üzerine etkileri anlamsız bulunmuştur. Dahası, melatoninin serum kreatinin düzeyini etkilemediği, buna karşın kan üre nitrojeninde ise belirgin bir düşüş sağladığı (kontrol grubuna kıyasla bile) gösterilmiştir. Biz ise melatoninin (10 mg/kg/gün, 14 gün) böbreklerdeki oksidatif stres artışını, bununla beraber yapısal bozulmaları ve apoptozisi de belirgin olarak sınırlandırdığını gösterdik.

Literatür incelendiğinde, ne yazık ki periodontitis ilişkili böbrek hasarı üzerine melatoninin rolünü araştıran kanıtlar çok sınırlıdır.¹⁰ Bununla birlikte bulgularımızla dolaylı olarak karşılaştırabileceğimiz, periodontitis ile immünolojik açıdan benzer sistemik etkilere sahip olduğu gösterilen pek çok DM ve obezite çalışmaları mevcuttur.²⁷⁰⁻²⁷³

Obezite aracılı inflamasyon, oksidatif stres, apoptoz ve mitokondriyal disfonksiyon, KBH'nin gelişmesinde ve ilerlemesinde oldukça önemlidir.²⁷⁴ Stacchiotti ve ark.²⁷² oluşturdukları deneysel modelde obez fareler ile kontrol farelerini karşılaştırdığında, obeziteyle ilişkili morfolojik değişikliklerin belirgin olduğunu; proksimal tübüllerde düzensiz, kısa kristal yuvarlak mitokondri ve apoptotik hücrelerin sayısında artış olduğunu gözlemlemişlerdir. Farelerin içme sularına eklenen melatonin uygulamasının mitokondrinin şeklini değiştirdiğini ve apoptotik yolu modüle ettiğini raporlamışlardır. Bu değişiklikler böbreklerdeki morfolojik hasar ve disfonksiyona karşı melatoninin potansiyel koruyucu etkinliğini göstermektedir.

Agil ve ark.²⁷³ obez ve buna bağlı oluşan diyabetik ratlarda yaptıkları çalışmada artmış idrar atılımı, artmış proteinüri ve azalmış kreatinin klirensi gibi çeşitli böbrek disfonksiyonu izlemişlerdir. 17 hafta boyunca 10 mg/kg/gün şeklinde ağızdan melatonin tedavisi uygulamışlar ve oluşan nefropati ile mitokondriyal disfonksiyonun iyileştiğini raporlamışlardır. Ayrıca azalmış toplam idrar hacmi, azalmış proteinüri ve artmış

kreatinin klirensi ile renal disfonksiyonun iyileştiğini gözlemlemişlerdir. Melatoninin obezite ve diabete bağı nefropati üzerindeki faydalı etkileri, mitokondriyal dinamik ve fonksiyonel bütünlüğün restorasyonuna, sistemik proinflatuar durum ve oksidatif stresin melatonin ile azaltılmasına bağı olabileceği düşünölmüştür.

Derlacz ve ark.²⁷⁰ 30 mM glikozun böbrek korteks hücrelerine inkübasyonunun ardından, ROT oluşumunda belirgin bir artış olduğunu ve buna bağı olarak DNA parçalanması, kromatin yoğunlaşması ve apoptozun indüklendiğini göstermişlerdir. Dahası, bu hiperglisemik durum 8-OHdG oluşumu ile protein peroksidasyonunu artırabilir ve GSH redoks durumunu bozabilir. Bu çalışma melatonin uygulamasının oksidatif stresi azaltarak ve GSH seviyesini artırarak böbrek hasarını iyileştirebileceğini göstermiştir.

Sainz ve ark.²⁷⁵ 'nın yaptığı çalışmada melatoninin, mitokondriden serbest radikal oluşumunu engelleyerek apoptozisi önlediğini rapor etmişlerdir. Kunduzova ve ark.¹²⁵ renal İ/R hasarlı ratlarda melatoninin uygulamasının lipit peroksidasyonu ve bir apoptoz belirteci olan kaspaz-3 ün aktivasyonunu baskıladığını tespit etmişlerdir. Melatoninin oksidatif strese bağı hücre hasarını azaltarak, serbest radikallerin tetiklediği hücre ölümünde anti-apoptotik ajan olarak rol alması ile açıklamışlardır.

Periodontitisli ratlarda böbrek fonksiyonel durumunu gösteren belirteçlerde belirgin bir bozulma tespit etmediğimizden melatoninin renal koruyucu etkilerini yeterince değerlendiremedik. Ancak periodontitisli ratlarda özellikle sistatin C seviyeleri ve üre kreatinin de tespit edilen hafif artışların melatonin grubunda düşüş gösterdiği göröldü. Bu sınırlı veri, Gulle ve ark.¹⁰ ile uyumlu olarak, renal koruyucu etkinliğe kanıt olarak gösterilebilir. Bu çalışma sınırları dahilinde melatoninin böbrek koruyucu etkilerinin hem periodontal cep bölgesi ve hem de direkt olarak hasarlı böbrek dokusu üzerine etkileri yoluyla gerçekleştiği düşünölebilir. Yapılan çalışmalarda insan ve

hayvanlarda melatoninin periodontitis ilişkili TNF- α ^{18, 276, 277}, IL-1 β ²⁷⁷, MDA¹⁶⁶, 8-OHdG¹⁶⁶, OSI¹⁹ ve RANKL^{18, 19, 166, 277}, in gingival doku ve serum düzeylerindeki artışları sınırlandırdığı, antioksidan durumu ise desteklediği gösterilmiştir.^{19, 166}

Köse ve ark.¹⁶⁶ 24 erkek ratın sol ve sağ mandibular birinci molar dişlerine 3.0 ipek ligatür yerleştirerek deneysel periodontitisi indüklemişlerdir. Daha sonra Dp-Mel grubunda ligatürler çıkarılıp melatonin (10 mg / vücut ağırlığı), Dp ve kontrol gruplarında da salin intraperitoneal olarak 14 gün süreyle uygulamışlar. Sekizinci haftanın ilk gününde tüm gruplarda ratların ötenazisini takiben mandibular ve kardiyak sol ventrikül doku örnekleri alınıp parametreler incelenmiş. MDA seviyelerinde önemli ölçüde artış; sol ventriküldeki GSH, süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (KAT) seviyelerinde ise hafif bir artış gözlenmiştir. Bununla birlikte oksidatif strese (8-OHdG ve OSI) önemli bir artış tespit etmişlerdir.^{166, 223}

Her ne kadar çalışmamızda direkt olarak değerlendirmemiş olsak da, melatoninin periodontal alandaki proinflamatuvar durum ve oksidatif stresi baskılaması yoluyla, buradan böbreklere ulaşan inflamatuvar irritasyonu azaltması muhtemeldir. Dahası, melatonin lipofilik yapısı sayesinde diğer tüm dokular gibi böbreklere de etkili bir şekilde nüfuz edebilir ve güçlü antioksidan, antiinflamatuvar ve immünmodülatör etkileri yoluyla dokudaki inflamasyonu ve yapısal hasarları sınırlandırabilir. Pek çok deneysel çalışmada melatonin uygulamasının hasarlı böbreklerde oksidatif^{13, 20, 24} ve nitrozatif^{20, 24} stresler ile apoptotik değişiklikleri¹³ baskıladığı, dahası böbrek fonksiyonlarındaki bozulmaları sınırlandırdığı^{16, 17, 20} gösterilmiştir.

Kunduzova ve ark.¹²⁵ melatonin ile ön tedavinin akut tübüler nekroz gelişimine karşı koruduğunu ve postreperfüzyon hasarından sonra böbrek fonksiyonunu iyileştirdiğini göstermiştir.

Aktoz ve ark.²¹⁷ yapmış olduğu çalışmada İ/R hasarı oluşturulan ratlarda üre, kreatinin ve MDA seviyelerinde önemli bir artış, SOD ve KAT aktivitelerinde ise azalma olduğunu ve böbrek dokularında tübüler nekroz olduğunu gözlemlemişlerdir. Melatonin tedavisinin MDA seviyesinde önemli bir azalma, SOD aktivitesinde ise artma olduğunu, dahası tübüler nekrozda dikkate değer bir azalma olduğunu belirtmişlerdir. Sonuç olarak melatoninin fonksiyonel, morfolojik ve biyokimyasal hasara karşı koruyucu etki gösteren etkili bir antioksidan olduğunu raporlamışlardır.

Çalışmamız kapsamlı olmasına rağmen bazı limitasyonlara sahiptir. Deneysel periodontitis modelinde destek doku yıkımı insanlardakinin aksine akut olarak ortaya çıkmakta ve yıkıcı bir şekilde ilerlemektedir. Şiddetli lokal inflamatuvar cevaba bağlı olarak belirgin sistemik inflamatuvar etkiler ortaya çıkmaktadır.¹³⁸ Bu sebeple bulgularımızın insanlardaki periodontitis ile direkt olarak ilişkilendirilmesi hatalı olabilir. İkinci olarak, deneye sadece erkek ratların dahil edilmesi bulguların her iki cinsiyet açısından yorumlanmasını mümkün kılmamaktadır. Son olarak, ne yazık ki ratlarda periodontitis tedavisinde etkinliği genel olarak kabul edilmiş bir melatonin uygulama protokolü (doz, uygulama şekli, uygulama zamanı, uygulama süresi vb.) henüz mevcut değildir. Bu bağlamda, bu can alıcı konuda insan çalışmalarına öncülük edebilecek yeni ve daha kapsamlı deneysel çalışmalara ihtiyaç olduğu açıktır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu deneysel çalışma;

1. Ratlarda 3.0 ipek ligatürün 35 gün süreyle uygulanmasının plak birikimi ve mekanik travmatizasyon yoluyla belirgin bir alveoler kemik kaybına neden olduğunu,
2. Periodontitis indüksiyon fazını hemen takiben uygulanan 14 günlük (10 mg/kg/gün) sistemik melatonin uygulamasının alveoler kemik kaybını belirgin olarak sınırlandırabildiğini,
3. Deneysel periodontitisin rat böbrek dokusunda oksidatif stres artışı ve apoptotik değişiklikler yanı sıra histopatolojik olarak dejenerasyonlara neden olduğunu,
4. Deneysel periodontitisin böbrek fonksiyonel parametrelerini belirgin olarak etkilemediğini,
5. Periodontitis indüksiyon fazını hemen takiben uygulanan 14 günlük (10 mg/kg/gün) sistemik melatonin tedavisinin ise söz konusu inflamatuvar ve yapısal bozulmaları belirgin olarak sınırlandırabildiğini ortaya koydu.

Böbrek dokusunda periodontitis tarafından provoke edilen, uzun dönemde fonksiyonel bozulmalara da neden olabilecek, oksidatif stres, enzimatik aktivite ve belirgin yapısal patolojilerin azaltılmasında melatonin önemli bir destek tedavi ajanı olabilir.

KAYNAKLAR

1. Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontology 2000*, 1997, 14: 9-11.
2. Chapple IL, Matthews JB. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontology 2000*, 2007, 43: 160-232.
3. Schenkein HA, Loos BG. Inflammatory mechanisms linking periodontal diseases to cardiovascular diseases. *Journal of periodontology*, 2013, 84: S51-S69.
4. Falcao A, Bullon P. A review of the influence of periodontal treatment in systemic diseases. *Periodontol 2000*, 2019, 79: 117-128.
5. Levey AS, de Jong PE, Coresh J, El Nahas M, Astor BC, Matsushita K, Gansevoort RT, Kasiske BL, Eckardt KU. The definition, classification, and prognosis of chronic kidney disease: a KDIGO Controversies Conference report. *Kidney international*, 2011, 80: 17-28.
6. Chambrone L, Foz AM, Guglielmetti MR, Pannuti CM, Artese HP, Feres M, Romito GA. Periodontitis and chronic kidney disease: a systematic review of the association of diseases and the effect of periodontal treatment on estimated glomerular filtration rate. *Journal of clinical periodontology*, 2013, 40: 443-456.
7. Harada F, Uehara O, Morikawa T, Hiraki D, Onishi A, Toraya S, Adhikari BR, Takai R, Yoshida K, Sato J. Effect of systemic administration of lipopolysaccharides derived from *Porphyromonas gingivalis* on gene expression in mice kidney. *Medical molecular morphology*, 2018, 51: 156-165.
8. Franca LFC, Vasconcelos A, da Silva FRP, Alves EHP, Carvalho JS, Lenardo DD, de Souza LKM, Barbosa ALR, Medeiros JR, de Oliveira JS, Vasconcelos DFP. Periodontitis changes renal structures by oxidative stress and lipid peroxidation. *Journal of clinical periodontology*, 2017, 44: 568-576.
9. Chen P, Xuan D, Zhang J. Periodontitis aggravates kidney damage in obese mice by MMP2 regulation. *Bratislavske Lekarske Listy*, 2017, 118: 740-745.
10. Gulle K, Akpolat M, Kurcer Z, Cengiz M, Baba F, Acikgoz S. Multi-organ injuries caused by lipopolysaccharide-induced periodontal inflammation in rats: role of melatonin. *Journal of periodontal research*, 2014, 49: 736-741.
11. Deschamps-Lenhardt S, Martin-Cabezas R, Hannedouche T, Huck O. Association between periodontitis and chronic kidney disease: Systematic review and meta-analysis. *Oral diseases*, 2019, 25: 385-402.
12. Wangerin C, Pink C, Endlich K, Rettig R, Stracke S, Nauck M, Volzke H, Kocher T, Holtfreter B. Long-term Association of Periodontitis With Decreased Kidney Function. *American Journal of Kidney Diseases*, 2019, 73: 513-524.
13. Mercantepe F, Mercantepe T, Topcu A, Yilmaz A, Tumkaya L. Protective effects of amifostine, curcumin, and melatonin against cisplatin-induced acute kidney injury. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 2018, 391: 915-931.
14. Giribabu N, Karim K, Kilari EK, Salleh N. *Phyllanthus niruri* leaves aqueous extract improves kidney functions, ameliorates kidney oxidative stress, inflammation, fibrosis and apoptosis and enhances kidney cell proliferation in adult male rats with diabetes mellitus. *Journal of ethnopharmacology*, 2017, 205: 123-137.
15. Claustrat B, Brun J, Chazot G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep medicine reviews*, 2005, 9: 11-24.
16. Potić M, Ignjatović I, Ničković VP, Živković JB, Krdžić JD, Mitić JS, Popović D, Ilić IR, Stojanović NM, Sokolović D. Two different melatonin treatment regimens

- prevent an increase in kidney injury marker-1 induced by carbon tetrachloride in rat kidneys. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 2019, 97: 422-428.
17. Oguz E, Yilmaz Z, Ozbilge H, Baba F, Tabur S, Yerer MB, Hekimoglu A. Effects of melatonin on the serum levels of pro-inflammatory cytokines and tissue injury after renal ischemia reperfusion in rats. *Renal failure*, 2015, 37: 318-322.
 18. Cutando A, López-Valverde A, de Diego RG, de Vicente J, Reiter R, Fernández MH, Ferrera MJ. Effect of topical application of melatonin to the gingiva on salivary osteoprotegerin, RANKL and melatonin levels in patients with diabetes and periodontal disease. *Odontology*, 2014, 102: 290-296.
 19. Kose O, Arabaci T, Kara A, Yemenoglu H, Kermen E, Kizildag A, Gedikli S, Ozkanlar S. Effects of melatonin on oxidative stress index and alveolar bone loss in diabetic rats with periodontitis. *Journal of periodontology*, 2016, 87: e82-e90.
 20. Kobroob A, Peerapanyasut W, Chattipakorn N, Wongmekiat O. Damaging effects of bisphenol A on the kidney and the protection by melatonin: emerging evidences from in vivo and in vitro studies. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018, 2018.
 21. Nabavi SM, Nabavi SF, Sureda A, Xiao J, Dehpour AR, Shirooie S, Silva AS, Baldi A, Khan H, Daglia M. Anti-inflammatory effects of Melatonin: A mechanistic review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 2019, 59: S4-S16.
 22. Virto L, Cano P, Jiménez-Ortega V, Fernández-Mateos P, González J, Haugen HJ, Esquifino AI, Sanz M. Melatonin as adjunctive therapy in the treatment of periodontitis associated with obesity. *Journal of clinical periodontology*, 2018, 45: 1336-1346.
 23. El-Sharkawy H, Elmeadawy S, Elshinnawi U, Anees M. Is dietary melatonin supplementation a viable adjunctive therapy for chronic periodontitis?—A randomized controlled clinical trial. *Journal of periodontal research*, 2019, 54: 190-197.
 24. Leibowitz A, Volkov A, Voloshin K, Shemesh C, Barshack I, Grossman E. Melatonin prevents kidney injury in a high salt diet-induced hypertension model by decreasing oxidative stress. *Journal of pineal research*, 2016, 60: 48-54.
 25. Williams RC. Periodontal disease. *New England Journal of Medicine*, 1990, 322: 373-382.
 26. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals Periodontology*, 1999, 4: 1-6.
 27. Kırzıoğlu FY. Periodontal Hastalıkların Epidemiyolojisi. İçinde: Çağlayan G (editör). *Periodontoloji ve İmplantoloji*, 1 Baskı. İstanbul, Quintessence yayıncılık, 2018: 125-142.
 28. Armitage GC. The complete periodontal examination. *Periodontology 2000*, 2004, 34: 22-33.
 29. Gomez RS, Dutra WO, Moreira PR. Epigenetics and periodontal disease: future perspectives. *Inflammation Research*, 2009, 58: 625-629.
 30. Denis F, Kinane PGSPNP. Periodontal diseases. *Nature Reviews Disease Primers*, 2017.
 31. Lindhe J, Lang NP. *Clinical periodontology and implant dentistry*. 6 Baskı. Wiley Blackwell 2015.
 32. İlhan D, Oktay I, Nur B, Fisekcioglu E, Lim S, Lepkowski JM, Ismail AI. Percentage and severity of periodontal diseases in Turkish adults aged 35+ years, 2009-10. *Journal of Public Health Dentistry*, 2017, 77: 325-333.
 33. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple IL, Jepsen S, Kornman KS, Mealey BL, Papananou PN, Sanz M, Tonetti MS. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions—Introduction and key changes from the 1999 classification. *Journal of periodontology*, 2018, 89: S1-S8.

34. Chapple IL, Mealey BL, Van Dyke TE, Bartold PM, Dommisch H, Eickholz P, Geisinger ML, Genco RJ, Glogauer M, Goldstein M. Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of periodontology*, 2018, 89: S74-S84.
35. Lang NP, Bartold PM. Periodontal health. *Journal of periodontology*, 2018, 89: S9-S16.
36. Huang S, Li Z, He T, Bo C, Chang J, Li L, He Y, Liu J, Charbonneau D, Li R, Xu J. Microbiota-based Signature of Gingivitis Treatments: A Randomized Study. *Scientific reports*, 2016, 6: 24705.
37. Murakami S, Mealey BL, Mariotti A, Chapple IL. Dental plaque-induced gingival conditions. *Journal of clinical periodontology*, 2018, 45: S17-S27.
38. Tonetti MS, Chapple IL, Jepsen S, Sanz M. Primary and secondary prevention of periodontal and peri-implant diseases: Introduction to, and objectives of the 11th European Workshop on Periodontology consensus conference. *Journal of clinical periodontology*, 2015, 42 Suppl 16: S1-4.
39. Sheiham A. Is the chemical prevention of gingivitis necessary to prevent severe periodontitis? *Periodontology 2000*, 1997, 15: 15-24.
40. Haraszthy VI, Zambon JJ, Sreenivasan PK. The antimicrobial efficacy of commercial dentifrices. *Journal of General Dentistry*, 2010, 58: 50-55; quiz 56-57, 79-80.
41. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *Journal of periodontology*, 2018, 89: S159-S172.
42. PM P, Klokkevold PR, Newman MG, Takei HH. Periodontal pathogenesis. İçinde: Newman MG, Carranza FA (editörler). *Carranza's clinical periodontology*, 12 Baskı. Elsevier Saunders, 2015: 76-100.
43. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, Flemmig TF, Garcia R, Giannobile WV, Graziani F. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of periodontology*, 2018, 89: S173-S182.
44. Billings M, Holtfreter B, Papapanou PN, Mitnik GL, Kocher T, Dye BA. Age-dependent distribution of periodontitis in two countries: Findings from NHANES 2009 to 2014 and SHIP-TREND 2008 to 2012. *Journal of clinical periodontology*, 2018, 45: S130-S148.
45. Yucel-Lindberg T, Bage T. Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 2013, 15: e7.
46. Di Benedetto A, Gigante I, Colucci S, Grano M. Periodontal disease: linking the primary inflammation to bone loss. *Clinical and Developmental Immunology*, 2013, 2013.
47. Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Laboratory Investigation*, 1976, 34: 235-249.
48. Seymour GJ, Trombelli L, Berglundh T. Pathogenesis of Gingivitis. İçinde: Lang NP, Lindhe J (editörler). *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*, 6 Baskı. Wiley Blackwell 2015: 241-255.
49. Tatakis DN, Kumar PS. Etiology and pathogenesis of periodontal diseases. *Dental Clinics of North America*, 2005, 49: 491-516, v.
50. Kinane DF. Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontology 2000*, 2001, 25: 8-20.

51. Duvall E, Wyllie AH, Morris RG. Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis). *Immunology*, 1985, 56: 351-358.
52. Savill JS, Wyllie AH, Henson JE, Walport MJ, Henson PM, Haslett C. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *Journal of Clinical Investigation*, 1989, 83: 865-875.
53. Medzhitov R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell*, 2010, 140: 771-776.
54. Amano A. Host-parasite interactions in periodontitis: microbial pathogenicity and innate immunity. *Periodontology 2000*, 2010, 54: 9-14.
55. Azuma M. Fundamental mechanisms of host immune responses to infection. *Journal of periodontal research*, 2006, 41: 361-373.
56. Cekici A, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontology 2000*, 2014, 64: 57-80.
57. Hienz SA, Paliwal S, Ivanovski S. Mechanisms of bone resorption in periodontitis. *Journal of immunology research*, 2015, 2015.
58. Sorsa T, Tjäderhane L, Konttinen YT, Lauhio A, Salo T, Lee HM, Golub LM, Brown DL, Mäntylä P. Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. *Annals of medicine*, 2006, 38: 306-321.
59. Sorsa T, Tjäderhane L, Salo T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral diseases*, 2004, 10: 311-318.
60. Domeij H, Yucel-Lindberg T, Modéer T. Signal pathways involved in the production of MMP-1 and MMP-3 in human gingival fibroblasts. *European journal of oral sciences*, 2002, 110: 302-306.
61. Domeij H, Modéer T, Quezada HC, Yucel-Lindberg T. Cell expression of MMP-1 and TIMP-1 in co-cultures of human gingival fibroblasts and monocytes: the involvement of ICAM-1. *Biochemical and biophysical research communications*, 2005, 338: 1825-1833.
62. Abe M, Kawamoto K, Okamoto H, Horiuchi N. Induction of collagenase-2 (matrix metalloproteinase-8) gene expression by interleukin-1 β in human gingival fibroblasts. *Journal of periodontal research*, 2001, 36: 153-159.
63. Kuo PJ, Tu HP, Chin YT, Lu SH, Chiang CY, Chen RY, Fu E. Cyclosporine-A inhibits MMP-2 and-9 activities in the presence of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide: an experiment in human gingival fibroblast and U937 macrophage co-culture. *Journal of periodontal research*, 2012, 47: 431-438.
64. Cochran DL. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *Journal of periodontology*, 2008, 79: 1569-1576.
65. Shackelford RE, Kaufmann WK, Paules RS. Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Radical Biology and Medicine*, 2000, 28: 1387-1404.
66. Wang Y, Andrukhov O, Rausch-Fan X. Oxidative stress and antioxidant system in periodontitis. *Frontiers in physiology*, 2017, 8: 910.
67. Sculley DV, Langley-Evans SC. Salivary antioxidants and periodontal disease status. *Proceedings of the Nutrition Society*, 2002, 61: 137-143.
68. Khalili J, Biloklytska H. Salivary malondialdehyde levels in clinically healthy and periodontal diseased individuals. *Oral diseases*, 2008, 14: 754-760.
69. Tsai C, Chen H, Chen S, Ho Y, Ho K, Wu Y, Hung C. Lipid peroxidation: a possible role in the induction and progression of chronic periodontitis. *Journal of periodontal research*, 2005, 40: 378-384.

70. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *International journal of biomedical science: IJBS*, 2008, 4: 89.
71. Scannapieco FA, Panesar M. Periodontitis and chronic kidney disease. *Journal of periodontology*, 2008, 79: 1617-1619.
72. Ismail G, Dumitriu HT, Dumitriu AS, Ismail FB. Periodontal disease: a covert source of inflammation in chronic kidney disease patients. *International Journal of Nephrology and Renovascular Disease*, 2013, 2013: 515796.
73. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*, 2002, 82: 47-95.
74. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2007, 39: 44-84.
75. Halliwell B, Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids. *Archives of biochemistry and biophysics*, 1990, 280: 1-8.
76. Yanbeyi S. Aspirin ve antioksidant buthylated hydroxyanisole'ün tavşanlarda eritrosit total katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri üzerine etkileri. Biyoloji Anabilim Dalı. Samsun: Ondokuz Mayıs Üniversitesi, 1999.
77. Dahiya P, Kamal R, Gupta R, Bhardwaj R, Chaudhary K, Kaur S. Reactive oxygen species in periodontitis. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 2013, 17: 411.
78. Young I, Woodside J. Antioxidants in health and disease. *Journal of clinical pathology*, 2001, 54: 176-186.
79. Sardi JdCO. Oxidative stress in diabetes and periodontitis. *North American Journal of Medical Sciences*, 2013: 58-59.
80. Boesing F, Patiño J, Da Silva V, Moreira E. The interface between obesity and periodontitis with emphasis on oxidative stress and inflammatory response. *Obesity reviews*, 2009, 10: 290-297.
81. Bullon P, Newman HN, Battino M. Obesity, diabetes mellitus, atherosclerosis and chronic periodontitis: a shared pathology via oxidative stress and mitochondrial dysfunction? *Periodontology 2000*, 2014, 64: 139-153.
82. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical biochemistry*, 2005, 38: 1103-1111.
83. Işık A, Selek S. Total antioxidant response and oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis. *Firat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Tıp Dergisi*, 2007, 21: 067-073.
84. Tuma DJ. Role of malondialdehyde-acetaldehyde adducts in liver injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 2002, 32: 303-308.
85. Baltacıoğlu E, Yuva P, Aydın G, Alver A, Kahraman C, Karabulut E, Akalın FA. Lipid peroxidation levels and total oxidant/antioxidant status in serum and saliva from patients with chronic and aggressive periodontitis. Oxidative stress index: a new biomarker for periodontal disease? *Journal of periodontology*, 2014, 85: 1432-1441.
86. Esen Ç, Alkan BA, Kırnar M, Akgül Ö, Işıkoğlu S, Erel Ö. The effects of chronic periodontitis and rheumatoid arthritis on serum and gingival crevicular fluid total antioxidant/oxidant status and oxidative stress index. *Journal of periodontology*, 2012, 83: 773-779.
87. Chen M, Cai W, Zhao S, Shi L, Chen Y, Li X, Sun X, Mao Y, He B, Hou Y. Oxidative stress-related biomarkers in saliva and gingival crevicular fluid associated with chronic periodontitis: A systematic review and meta-analysis. *Journal of clinical periodontology*, 2019, 46: 608-622.
88. Dursun E, Akalın FA, Genc T, Cinar N, Erel O, Yildiz BO. Oxidative stress and periodontal disease in obesity. *Medicine*, 2016, 95.

89. Khoschsorur G, Winklhofer-Roob B, Rabl H, Auer T, Peng Z, Schaur R. Evaluation of a sensitive HPLC method for the determination of malondialdehyde, and application of the method to different biological materials. *Chromatographia*, 2000, 52: 181-184.
90. Cobanoglu U, Demir H, Cebi A, Sayir F, Alp HH, Akan Z, Gur T, Bakan E. Lipid peroxidation, DNA damage and coenzyme Q10 in lung cancer patients—markers for risk assessment. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2011, 12: 1399-1403.
91. Porter NA. Mechanisms for the autoxidation of polyunsaturated lipids. *Accounts of Chemical Research*, 1986, 19: 262-268.
92. Stehbens WE. Oxidative stress in viral hepatitis and AIDS. *Experimental and molecular pathology*, 2004, 77: 121-132.
93. Hodgson PD, Aich P, Stookey J, Popowych Y, Potter A, Babiuk L, Griebel PJ. Stress significantly increases mortality following a secondary bacterial respiratory infection. *Veterinary Research*, 2012, 43: 21.
94. Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, Dhama K. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *BioMed research international*, 2014, 2014.
95. Meister A, Larsson A. Glutathione synthetase deficiency and other disorders of the gamma-glutamyl cycle. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 1995, 1: 1461-1495.
96. Marrocco I, Altieri F, Peluso I. Measurement and clinical significance of biomarkers of oxidative stress in humans. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017, 2017.
97. Mårtensson J, Lai J, Meister A. High-affinity transport of glutathione is part of a multicomponent system essential for mitochondrial function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1990, 87: 7185-7189.
98. Chai Y-C, Ashraf SS, Rokutan K, Johnston RB, Thomas JA. S-thiolation of individual human neutrophil proteins including actin by stimulation of the respiratory burst: evidence against a role for glutathione disulfide. *Archives of biochemistry and biophysics*, 1994, 310: 273-281.
99. Reed DJ. Glutathione depletion and susceptibility. *Pharmacological Reviews*, 1984, 36: 25S-33S.
100. Griffith OW, Meister A. Glutathione: interorgan translocation, turnover, and metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1979, 76: 5606-5610.
101. Hayes JD, McLellan LI. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free radical research*, 1999, 31: 273-300.
102. Altunören O, Aydın G, Güngör Ö. Böbrek anatomisi. İçinde: Arınsoy T, Güngör Ö, Koçyiğit İ (editörler). *Böbrek Fizyopatolojisi*, İstanbul, Kitap masası, 2017: 1-6.
103. Ross MH, Kaye G, Pawlina W. *Histology A Text and Atlas*. 4. baskı. 2003.
104. Young B, JW H. *Wheater's Functional Histology*. Edinburgh: Churchill Livingstone. 2000.
105. Levy MN, Koeppen BM, Stanton BA. *Berne & Levy Principles of Physiology*. 4 Baskı. Elsevier, 2005.
106. Hall JE. *Guyton and Hall textbook of medical physiology*. 13 Baskı. Elsevier, 2016.
107. Clatworthy M. *Nephrology: clinical cases uncovered*. Çeviri: Ertürk Ş. *Nefroloji: Klinik olgu çözümleri*, 1 Baskı. Adana, Nobel kitabevi, 2011.
108. Zhang JL, Rusinek H, Chandarana H, Lee VS. Functional MRI of the kidneys. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 2013, 37: 282-293.

109. Srivastava A, Hunter JM. Reversal of neuromuscular block. *British Journal of Anaesthesia*, 2009, 103: 115-129.
110. DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *The American journal of clinical nutrition*, 2004, 80: 1689S-1696S.
111. Jelkmann W. Regulation of erythropoietin production. *The Journal of Physiology*, 2011, 589: 1251-1258.
112. Sparks MA, Crowley SD, Gurley SB, Mirosou M, Coffman TM. Classical renin-angiotensin system in kidney physiology. *Comprehensive Physiology*, 2011, 4: 1201-1228.
113. Rennke HG, Denker BM. Çeviri: Ecdar T. 2 Baskı. İstanbul, İstanbul Medikal Yayıncılık, 2012.
114. Koçak MG, Bakırdöğen S, Altun B. Renal fizyoloji. İçinde: Arınsoy T, Güngör Ö, Koçyiğit İ (editörler). *Böbrek Fizyopatolojisi*, İstanbul, Kitap masası, 2017: 7-24.
115. Ok ES, Altun B. Böbrek fonksiyonlarının değerlendirilmesi. İçinde: Arınsoy T, Güngör Ö, Koçyiğit İ (editörler). *Böbrek Fizyopatolojisi*, İstanbul, Kitap masası, 2017: 25-36.
116. Shemesh O, Golbetz H, Kriss JP, Myers BD. Limitations of creatinine as a filtration marker in glomerulopathic patients. *Kidney international*, 1985, 28: 830-838.
117. Perrone RD, Madias NE, Levey AS. Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts. *Clinical chemistry*, 1992, 38: 1933-1953.
118. Grubb A. Cystatin C for GFR. *Adv clinical chemistry*, 2001, 35: 53-59.
119. Iwasaki M, Taylor GW, Sato M, Nakamura K, Yoshihara A, Miyazaki H. Cystatin C-based estimated glomerular filtration rate and periodontitis. *Gerodontology*, 2016, 33: 328-334.
120. Akşit H, Bildik A. Apoptozis. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2008, 19: 55-63.
121. Clarkson PM, Thompson HS. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *The American journal of clinical nutrition*, 2000, 72: 637S-646S.
122. Barret K, Barman S, Boitano S, Brooks H. Ganong'un Tıbbi Fizyolojisi, 23. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2011: 539-548.
123. Sjöström J, Bergh J. How apoptosis is regulated, and what goes wrong in cancer. *Bmj*, 2001, 322: 1538-1539.
124. Sinanoğlu O, Sezgin G, Oztürk G, Tuncdemir M, Güney S, Aksungar FB, Yener N. Melatonin with 1, 25-dihydroxyvitamin D3 protects against apoptotic ischemia-reperfusion injury in the rat kidney. *Renal failure*, 2012, 34: 1021-1026.
125. Kunduzova OR, Escourrou G, Seguelas M-H, Delagrance P, De La Farge F, Cambon C, Parini A. Prevention of apoptotic and necrotic cell death, caspase-3 activation, and renal dysfunction by melatonin after ischemia/reperfusion. *The FASEB journal*, 2003, 17: 1-17.
126. Cocchiario P, De Pasquale V, Della Morte R, Tafuri S, Avallone L, Pizard A, Moles A, Pavone LM. The multifaceted role of the lysosomal protease cathepsins in kidney disease. *Frontiers in cell and developmental biology*, 2017, 5: 114.
127. Lertpimonchai A, Rattanasiri S, Tamsailom S, Champaiboon C, Ingsathit A, Kitiyakara C, Limpianunchai A, Attia J, Sritara P, Thakkinstian A. Periodontitis as the risk factor of chronic kidney disease: Mediation analysis. *Journal of clinical periodontology*, 2019, 46: 631-639.
128. Hebert LA, Wilmer WA, Falkenhain ME, Ladson-Wofford SE, Nahman NS, Jr., Rovin BH. Renoprotection: one or many therapies? *Kidney international*, 2001, 59: 1211-1226.

129. Chambrone L, Foz AM, Guglielmetti MR, Pannuti CM, Artese HP, Feres M, Romito GA. Periodontitis and chronic kidney disease: a systematic review of the association of diseases and the effect of periodontal treatment on estimated glomerular filtration rate. *J Clin Periodontol*, 2013, 40: 443-456.
130. Grubbs V, Vittinghoff E, Beck JD, Kshirsagar AV, Wang W, Griswold ME, Powe NR, Correa A, Young B. Association between periodontal disease and kidney function decline in African Americans: The Jackson Heart Study. *Journal of periodontology*, 2015, 86: 1126-1132.
131. Almeida S, Figueredo C, Lemos C, Bregman R, Fischer R. Periodontal treatment in patients with chronic kidney disease: a pilot study. *Journal of periodontal research*, 2017, 52: 262-267.
132. Takeuchi Y, Ishikawa H, Inada M, Shinozuka O, Umeda M, Yamazaki T. Study of the oral microbial flora in patients with renal disease. *Nephrology*, 2007, 12: 182-190.
133. Kapellas K, Singh A, Bertotti M, Nascimento GG, Jamieson LM, collaboration PC. Periodontal and chronic kidney disease association: A systematic review and meta-analysis. *Nephrology*, 2019, 24: 202-212.
134. Davidovich E, Schwarz Z, Davidovitch M, Eidelman E, Bimstein E. Oral findings and periodontal status in children, adolescents and young adults suffering from renal failure. *Journal of clinical periodontology*, 2005, 32: 1076-1082.
135. Yoshihara A, Deguchi T, Hanada N, Miyazaki H. Renal function and periodontal disease in elderly Japanese. *Journal of periodontology*, 2007, 78: 1241-1248.
136. Borawski J, Wilczyńska-Borawska M, Stokowska W, Myśliwiec M. The periodontal status of pre-dialysis chronic kidney disease and maintenance dialysis patients. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2007, 22: 457-464.
137. Castillo A, Mesa F, Liébana J, García-Martínez O, Ruiz S, Garcia-Valdecasas J, O'Valle F. Periodontal and oral microbiological status of an adult population undergoing haemodialysis: a cross-sectional study. *Oral diseases*, 2007, 13: 198-205.
138. Tomofuji T, Ekuni D, Irie K, Azuma T, Tamaki N, Maruyama T, Yamamoto T, Watanabe T, Morita M. Relationships between periodontal inflammation, lipid peroxide and oxidative damage of multiple organs in rats. *Biomedical Research*, 2011, 32: 343-349.
139. de Souza CM, Braosi APR, Luczyszyn SM, Avila AR, de Brito Jr RB, Ignacio SA, Probst CM, Riella MC, Sotomaior VS, Mira MT. Association between vitamin D receptor gene polymorphisms and susceptibility to chronic kidney disease and periodontitis. *Blood purification*, 2007, 25: 411-419.
140. Yamalik N, Delilbasi L, Gülay H, Caglayan F, Haberal M, Caglayan G. The histological investigation of gingiva from patients with chronic renal failure, renal transplants, and periodontitis: a light and electron microscopic study. *Journal of periodontology*, 1991, 62: 737-744.
141. Graziani F, Cei S, La Ferla F, Vano M, Gabriele M, Tonetti M. Effects of non-surgical periodontal therapy on the glomerular filtration rate of the kidney: an exploratory trial. *Journal of clinical periodontology*, 2010, 37: 638-643.
142. Artese HPC, Sousa COD, Luiz RR, Sansone C, Torres MCMdB. Effect of non-surgical periodontal treatment on chronic kidney disease patients. *Brazilian oral research*, 2010, 24: 449-454.
143. Gulle K, Akpolat M, Kurcer Z, Cengiz MI, Baba F, Acikgoz S. Multi-organ injuries caused by lipopolysaccharide-induced periodontal inflammation in rats: role of melatonin. *J Periodontal Res*, 2014, 49: 736-741.

144. Mercantepe F, Mercantepe T, Topcu A, Yilmaz A, Tumkaya L. Protective effects of amifostine, curcumin, and melatonin against cisplatin-induced acute kidney injury. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2018, 391: 915-931.
145. Giribabu N, Karim K, Kilari EK, Salleh N. Phyllanthus niruri leaves aqueous extract improves kidney functions, ameliorates kidney oxidative stress, inflammation, fibrosis and apoptosis and enhances kidney cell proliferation in adult male rats with diabetes mellitus. *J Ethnopharmacol*, 2017, 205: 123-137.
146. Kuş İ, Sarsılmaz M. Pineal bezin morfolojik yapısı ve fonksiyonları. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 2002, 22: 221-226.
147. Reiter RJ. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocrine Reviews*, 1991, 12: 151-180.
148. Brzezinski A. Melatonin in humans. *The New England Journal of Medicine*, 1997, 336: 186-195.
149. Şener G. Karanlığın hormonu: melatonin. *Marmara Eczacılık Dergisi*, 2010, 14: 112-120.
150. Fourtillan JB, Brisson AM, Fourtillan M, Ingrand I, Decourt JP, Girault J. Melatonin secretion occurs at a constant rate in both young and older men and women. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2001, 280: E11-E22.
151. Cutando A, Gomez-Moreno G, Arana C, Acuna-Castroviejo D, Reiter RJ. Melatonin: potential functions in the oral cavity. *Journal of periodontology*, 2007, 78: 1094-1102.
152. Meenakshi SS, Malaiappan S. Role of melatonin in periodontal disease-A systematic review. *Indian Journal of Dental Research*, 2020, 31: 593.
153. Acuna-Castroviejo D, Escames G, Venegas C, Diaz-Casado ME, Lima-Cabello E, Lopez LC, Rosales-Corral S, Tan DX, Reiter RJ. Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2014, 71: 2997-3025.
154. Macchi MM, Bruce JN. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 2004, 25: 177-195.
155. Touitou Y. Human aging and melatonin. Clinical relevance. *Experimental Gerontology*, 2001, 36: 1083-1100.
156. Cardinali DP, Pevet P. Basic aspects of melatonin action. *Sleep medicine reviews*, 1998, 2: 175-190.
157. Nowak JZ, Zawilska JB. Melatonin and its physiological and therapeutic properties. *Pharmacy World and Science*, 1998, 20: 18-27.
158. Scheer FA, Czeisler CA. Melatonin, sleep, and circadian rhythms. *Sleep medicine reviews*, 2005, 9: 5-9.
159. Tsuzuki K, Okamoto-Mizuno K, Mizuno K. Effects of humid heat exposure on sleep, thermoregulation, melatonin, and microclimate. *Journal of Thermal Biology*, 2004, 29: 31-36.
160. Reppart SM, Weaver DR, Godson C. Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. *Trends in pharmacological sciences*, 1996, 17: 100-102.
161. Claustrat B, Leston J. Melatonin: Physiological effects in humans. *Neurochirurgie*, 2015, 61: 77-84.
162. Turgut M, Baka M, Yurtseven M. Pineal gland'dan salgılanan bir nörohormon olan melatoninin etkileri. *Arşiv*, 2002, 11: 453-470.
163. Oztekin E, Mogulkoc R, Baltaci A, Tiftik A. The influence of estradiol and progesterone and melatonin supplementation on TNF-a levels in ovariectomized and pinealectomized rats. *Acta Biologica Hungarica*, 2006, 57: 275-281.

164. Ozturk A, Baltaci AK, Bediz CS, Mogulkoc R, Gungor S. Effects of zinc and melatonin deficiency on testicular tissue of rats. *Biol Trace Elem Res*, 2003, 96: 255-262.
165. Opie LH, Lecour S. Melatonin has multiorgan effects. *European Heart Journal–Cardiovascular Pharmacotherapy*, 2016, 2: 258-265.
166. Köse O, Bayrakdar SK, Akyıldız K, Altın A, Arabacı T, Yemenoglu H, Zihni Korkmaz M, Köse TE, Türker Sener L, Mercantepe T. Melatonin ameliorates periodontitis related inflammatory stress at cardiac left ventricular tissues in rats. *Journal of periodontology*, 2020.
167. Sewerynek E. Melatonin and the cardiovascular system. *Neuroendocrinology Letters*, 2002, 23: 79-83.
168. Paulis L, Šimko F. Blood pressure modulation and cardiovascular protection by melatonin: potential mechanisms behind. *Physiological research*, 2007, 56.
169. Kara A, Akman S, Ozkanlar S, Tozoglu U, Kalkan Y, Canakci CF, Tozoglu S. Immune modulatory and antioxidant effects of melatonin in experimental periodontitis in rats. *Free Radical Biology and Medicine*, 2013, 55: 21-26.
170. Reiter RJ, Tan DX, Rosales-Corral S, Galano A, Zhou XJ, Xu B. Mitochondria: central organelles for melatonin' s antioxidant and anti-aging actions. *Molecules*, 2018, 23: 509.
171. Tordjman S, Chokron S, Delorme R, Charrier A, Bellissant E, Jaafari N, Fougere C. Melatonin: pharmacology, functions and therapeutic benefits. *Current neuropharmacology*, 2017, 15: 434-443.
172. Tan D-X, Manchester LC, Reiter RJ, Qi W-B, Karbownik M, Calvo JR. Significance of melatonin in antioxidative defense system: reactions and products. *Neurosignals*, 2000, 9: 137-159.
173. Tan D, Reiter RJ, Manchester LC, Yan M, El-Sawi M, Sainz RM, Mayo JC, Kohen R, Allegra M, Hardeland R. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Current topics in medicinal chemistry*, 2002, 2: 181-197.
174. Castroviejo D, Escames G, Carazo A, León J, Khaldy H, Reiter RJ. Melatonin, mitochondrial homeostasis and mitochondrial-related diseases. *Current topics in medicinal chemistry*, 2002, 2: 133-151.
175. Meki A-RM, Hussein AA. Melatonin reduces oxidative stress induced by ochratoxin A in rat liver and kidney. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2001, 130: 305-313.
176. El-Sokkary GH, Omar HM, Hassanein A-FM, Cuzzocrea S, Reiter RJ. Melatonin reduces oxidative damage and increases survival of mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Free Radical Biology and Medicine*, 2002, 32: 319-332.
177. Hsu C-H, Chi B-C, Liu M-Y, Li J-H, Chen C-J, Chen R-Y. Phosphine-induced oxidative damage in rats: role of glutathione. *Toxicology*, 2002, 179: 1-8.
178. Ustundag B, Kazez A, Demirbag M, Canatan H, Halifeoglu I, Ozercan IH. Protective effect of melatonin on antioxidative system in experimental ischemia-reperfusion of rat small intestine. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2000, 10: 229-236.
179. Cabeza J, Motilva V, Martín MaJ, de la Lastra CA. Mechanisms involved in gastric protection of melatonin against oxidant stress by ischemia-reperfusion in rats. *Life Sciences*, 2001, 68: 1405-1415.
180. Özbek E, Turkoz Y, Sahna E, Ozugurlu F, Mizrak B, Ozbek M. Melatonin administration prevents the nephrotoxicity induced by gentamicin. *BJU international*, 2000, 85: 742-746.

181. Gultekin F, Delibas N, Yasar S, Kilinc I. In vivo changes in antioxidant systems and protective role of melatonin and a combination of vitamin C and vitamin E on oxidative damage in erythrocytes induced by chlorpyrifos-ethyl in rats. *Archives of toxicology*, 2001, 75: 88-96.
182. Anwar MM, Moustafa MA. The effect of melatonin on eye lens of rats exposed to ultraviolet radiation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2001, 129: 57-63.
183. Sailaja Devi M, Suresh Y, Das U. Preservation of the antioxidant status in chemically-induced diabetes mellitus by melatonin. *Journal of pineal research*, 2000, 29: 108-115.
184. Vural H, Sabuncu T, Arslan SO, Aksoy N. Melatonin inhibits lipid peroxidation and stimulates the antioxidant status of diabetic rats. *Journal of pineal research*, 2001, 31: 193-198.
185. Wahab MHA, Akoul E-SE, Abdel-Aziz A-AH. Modulatory effects of melatonin and vitamin E on doxorubicin-induced cardiotoxicity in Ehrlich ascites carcinoma-bearing mice. *Tumori Journal*, 2000, 86: 157-162.
186. Kaya H, Delibas N, Serteser M, Ulukaya E, Özkaya O. The effect of melatonin on lipid peroxidation during radiotherapy in female rats. *Strahlentherapie und Onkologie*, 1999, 175: 285-288.
187. Carlberg C. Gene regulation by melatonin. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2000, 917: 387-396.
188. Baltaci AK, Mogulkoc R, Bediz CS, Pekel A. Effects of zinc deficiency and pinealectomy on cellular immunity in rats infected with *Toxoplasma gondii*. *Biological Trace Element Research*, 2005, 104: 47-56.
189. Luo J, Zhang Z, Sun H, Song J, Chen X, Huang J, Lin X, Zhou R. Effect of melatonin on T/B cell activation and immune regulation in pinealectomy mice. *Life Sciences*, 2020, 242: 117191.
190. Wei W, Shen Y-X, Dai M, Chen Q. Effects and mechanisms of melatonin on immune responses in mice of different months. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2003, 24: 719-723.
191. Chen Q, Wei W. Effects and mechanisms of melatonin on inflammatory and immune responses of adjuvant arthritis rat. *International immunopharmacology*, 2002, 2: 1443-1449.
192. Rohr UD, Herold J. Melatonin deficiencies in women. *Maturitas*, 2002, 41 Suppl 1: S85-104.
193. Ölmez E, Şahna E, Ağkadir M, Acet A. Melatonin: Emeklilik Yaşı 80 Olur mu? *Journal of Inonu University Medical Faculty*, 2010, 7: 177-187.
194. Hotchkiss AK, Nelson RJ. Melatonin and immune function: hype or hypothesis? *Critical Reviews in Immunology*, 2002, 22: 351-371.
195. Tinto M, Sartori M, Pizzi I, Verga A, Longoni S. Melatonin as host modulating agent supporting nonsurgical periodontal therapy in patients affected by untreated severe periodontitis: A preliminary randomized, triple-blind, placebo-controlled study. *Journal of periodontal research*, 2020, 55: 61-67.
196. Najeeb S, Khurshid Z, Zohaib S, Zafar MS. Therapeutic potential of melatonin in oral medicine and periodontology. *The Kaohsiung journal of medical sciences*, 2016, 32: 391-396.
197. Köse O, Arabaci T, Kizildag A, Erdemci B, Özkal Eminoğlu D, Gedikli S, Özkanlar S, Zihni M, Albayrak M, Kara A. Melatonin prevents radiation-induced oxidative stress and periodontal tissue breakdown in irradiated rats with experimental periodontitis. *Journal of periodontal research*, 2017, 52: 438-446.

198. Arabacı T, Kermen E, Özkanlar S, Köse O, Kara A, Kızıldağ A, Duman ŞB, Ibişoğlu E. Therapeutic effects of melatonin on alveolar bone resorption after experimental periodontitis in rats: a biochemical and immunohistochemical study. *Journal of periodontology*, 2015, 86: 874-881.
199. Akman S, Canakci V, Kara A, Tozoglu U, Arabaci T, Dagsuyu İM. Therapeutic effects of alpha lipoic acid and vitamin C on alveolar bone resorption after experimental periodontitis in rats: a biochemical, histochemical, and stereologic study. *Journal of periodontology*, 2013, 84: 666-674.
200. Botelho M, Martins J, Ruela R, I R, Santos J, Soares J, França M, Montenegro D, Ruela W, Barros L. Protective effect of locally applied carvacrol gel on ligature-induced periodontitis in rats: a tapping mode AFM study. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 2009, 23: 1439-1448.
201. Lucas L, Russell A, Keast R. Molecular mechanisms of inflammation. Anti-inflammatory benefits of virgin olive oil and the phenolic compound oleocanthal. *Current pharmaceutical design*, 2011, 17: 754-768.
202. Dodington DW, Fritz PC, Sullivan PJ, Ward WE. Higher intakes of fruits and vegetables, β -carotene, vitamin C, α -tocopherol, EPA, and DHA are positively associated with periodontal healing after nonsurgical periodontal therapy in nonsmokers but not in smokers. *The Journal of nutrition*, 2015, 145: 2512-2519.
203. Reiter R, Rosales-Corral S, Liu X, Acuna-Castroviejo D, Escames G, Tan DX. Melatonin in the oral cavity: physiological and pathological implications. *Journal of periodontal research*, 2015, 50: 9-17.
204. Permuy M, López-Peña M, González-Cantalapiedra A, Muñoz F. Melatonin: A review of its potential functions and effects on dental diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18: 865.
205. Mauriz JL, Collado PS, Veneroso C, Reiter RJ, González-Gallego J. A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. *Journal of pineal research*, 2013, 54: 1-14.
206. Cutando A, Gómez-Moreno G, Villalba J, Ferrera MJ, Escames G, Acuña-Castroviejo D. Relationship between salivary melatonin levels and periodontal status in diabetic patients. *Journal of pineal research*, 2003, 35: 239-244.
207. Cutando A, Galindo P, Gómez-Moreno G, Arana C, Bolanos J, Acuña-Castroviejo D, Wang HL. Relationship between salivary melatonin and severity of periodontal disease. *Journal of periodontology*, 2006, 77: 1533-1538.
208. Hu W, Ma Z, Jiang S, Fan C, Deng C, Yan X, Di S, Lv J, Reiter RJ, Yang Y. Melatonin: the dawning of a treatment for fibrosis? *Journal of pineal research*, 2016, 60: 121-131.
209. Hrenak J, Paulis L, Repova K, Aziriova S, J Nagtegaal E, J Reiter R, Simko F. Melatonin and renal protection: novel perspectives from animal experiments and human studies. *Current pharmaceutical design*, 2015, 21: 936-949.
210. Kilic U, Kilic E, Tuzcu Z, Tuzcu M, Ozercan IH, Yilmaz O, Sahin F, Sahin K. Melatonin suppresses cisplatin-induced nephrotoxicity via activation of Nrf-2/HO-1 pathway. *Nutrition & metabolism*, 2013, 10: 1-8.
211. Yousef JM, Chen G, Hill PA, Nation RL, Li J. Melatonin attenuates colistin-induced nephrotoxicity in rats. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2011, 55: 4044-4049.
212. Ogeturk M, Kus I, Kavakli A, Oner J, Kukner A, Sarsilmaz M. Reduction of carbon tetrachloride-induced nephropathy by melatonin administration. *Cell*

Biochemistry and Function: Cellular biochemistry and its modulation by active agents or disease, 2005, 23: 85-92.

213. Adewole S, Salako A, Doherty O, Naicker T. Effect of melatonin on carbon tetrachloride-induced kidney injury in Wistar rats. *African Journal of Biomedical Research*, 2007, 10.

214. Isaka Y, Kimura T, Takabatake Y. The protective role of autophagy against aging and acute ischemic injury in kidney proximal tubular cells. *Autophagy*, 2011, 7: 1085-1087.

215. Brooks C, Wei Q, Cho S-G, Dong Z. Regulation of mitochondrial dynamics in acute kidney injury in cell culture and rodent models. *The Journal of clinical investigation*, 2009, 119: 1275-1285.

216. Nisari M, Yay A, Ertekin T, Al Ö, Ceylan D, Önder G, Kavutcu M. Evaluation of protective effects of melatonin on free radical metabolism in rat kidney during ischemia-reperfusion. *Ukrainian Journal of Nephrology and Dialysis*, 2019: 20-29.

217. Aktoz T, Aydogdu N, Alagol B, Yalcin O, Huseyinova G, Atakan IH. The protective effects of melatonin and vitamin E against renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Renal failure*, 2007, 29: 535-542.

218. Ahmadiasl N, Banaei S, Alihemmati A. Combination antioxidant effect of erythropoietin and melatonin on renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Iranian journal of basic medical sciences*, 2013, 16: 1209.

219. Erşahin M, Şehirli Ö, Toklu HZ, Süleymanoglu S, Emekli-Alturfan E, Yarat A, Tatlıdede E, Yeğen BÇ, Şener G. Melatonin improves cardiovascular function and ameliorates renal, cardiac and cerebral damage in rats with renovascular hypertension. *Journal of pineal research*, 2009, 47: 97-106.

220. Simko F, Baka T, Krajcirovicova K, Repova K, Aziriova S, Zorad S, Poglitsch M, Adamcova M, Reiter RJ, Paulis L. Effect of melatonin on the renin-angiotensin-aldosterone system in L-NAME-induced hypertension. *Molecules*, 2018, 23: 265.

221. Elmubarak SMEO. Sıçan böbrek dokusunda karbon tetraklorür (CCl₄) toksisitesine karşı melatonin ve D vitamininin koruyucu etisi. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı. Ankara: Ankara Üniversitesi 2015.

222. Deniz GY, Laloglu E, Altun S, Yiğit N, Gezer A. Antioxidant and anti-apoptotic effects of vitexilactone on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Biotechnic & Histochemistry*, 2020, 95: 381-388.

223. Köse O, Arabacı T, Yemenoglu H, Ozkanlar S, Kurt N, Gumussoy I, Gedikli S, Kara A. Influence of experimental periodontitis on cardiac oxidative stress in rats: a biochemical and histomorphometric study. *Journal of periodontal research*, 2017, 52: 603-608.

224. Draper H, Hadley M. [43] Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. İçinde: *Methods in enzymology*, Elsevier, 1990: 421-431.

225. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of biochemistry and biophysics*, 1959, 82: 70-77.

226. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clinical biochemistry*, 2004, 37: 112-119.

227. Sung MJ, Kim DH, Jung YJ, Kang KP, Lee AS, Lee S, Kim W, Davaatseren M, Hwang J-T, Kim H-J. Genistein protects the kidney from cisplatin-induced injury. *Kidney international*, 2008, 74: 1538-1547.

228. Mercantepe T, Unal D, Selli J, Mercantepe F, Unal B, Karabiyik TN. Protective effects of estrogen and bortezomib in kidney tissue of post-menopausal rats: An ultrastructural study. *Renal failure*, 2016, 38: 1129-1135.

229. Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Animal models for periodontal regeneration and peri-implant responses. *Periodontology* 2000, 2015, 68: 66-82.
230. Graves DT, Fine D, Teng YTA, Van Dyke TE, Hajishengallis G. The use of rodent models to investigate host–bacteria interactions related to periodontal diseases. *Journal of clinical periodontology*, 2008, 35: 89-105.
231. Beery AK, Zucker I. Sex bias in neuroscience and biomedical research. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 2011, 35: 565-572.
232. Klein SL, Schiebinger L, Stefanick ML, Cahill L, Danska J, De Vries GJ, Kibbe MR, McCarthy MM, Mogil JS, Woodruff TK. Opinion: sex inclusion in basic research drives discovery. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2015, 112: 5257-5258.
233. Caligioni CS. Assessing reproductive status/stages in mice. *Current protocols in neuroscience*, 2009, 48: A. 4I. 1-A. 4I. 8.
234. Kozłowska A, Przybylski M, Lianeri M, Jagodzinski P. Down-regulation of CXCR4 expression by tamoxifen is associated with DNA methyltransferase 3B up-regulation in MCF-7 breast cancer cells. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 2009, 63: 586-591.
235. Nugent BM, Schwarz JM, McCarthy MM. Hormonally mediated epigenetic changes to steroid receptors in the developing brain: implications for sexual differentiation. *Hormones and behavior*, 2011, 59: 338-344.
236. Schwarz JM, Nugent BM, McCarthy MM. Developmental and hormone-induced epigenetic changes to estrogen and progesterone receptor genes in brain are dynamic across the life span. *Endocrinology*, 2010, 151: 4871-4881.
237. Bjornsson TD, Callaghan JT, Einolf HJ, Fischer V, Gan L, Grimm S, Kao J, King SP, Miwa G, Ni L. The conduct of in vitro and in vivo drug-drug interaction studies: a PhRMA perspective. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 2003, 43: 443-469.
238. Ekuni D, Yamamoto T, Yamanaka R, Tachibana K, Watanabe T. Proteases augment the effects of lipopolysaccharide in rat gingiva. *Journal of periodontal research*, 2003, 38: 591-596.
239. Kuhr A, Popa-Wagner A, Schmoll H, Schwahn C, Kocher T. Observations on experimental marginal periodontitis in rats. *Journal of periodontal research*, 2004, 39: 101-106.
240. Di Paola R, Mazzon E, Rotondo F, Dattola F, Britti D, De Majo M, Genovese T, Cuzzocrea S. Reduced development of experimental periodontitis by treatment with M40403, a superoxide dismutase mimetic. *European journal of pharmacology*, 2005, 516: 151-157.
241. Stasi A, Intini A, Divella C, Franzin R, Montemurno E, Grandaliano G, Ronco C, Fiaccadori E, Pertosa GB, Gesualdo L. Emerging role of Lipopolysaccharide binding protein in sepsis-induced acute kidney injury. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2017, 32: 24-31.
242. Vasconcelos DFP, Pereira da Silva FR, Pinto MeSC, Santana LdAB, Souza IG, Miranda de Souza LK, Oliveira NCM, Ventura CA, Novaes PD, Barbosa ALdR. Decrease of pericytes is associated with liver disease caused by ligature-induced periodontitis in rats. *Journal of periodontology*, 2017, 88: e49-e57.
243. Matés JM, Pérez-Gómez C, De Castro IN. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical biochemistry*, 1999, 32: 595-603.
244. Schirli AO, Sener G, Satiroglu H, Ayanoğlu-Dülger G. Protective effect of N-acetylcysteine on renal ischemia/reperfusion injury in the rat. *Journal of nephrology*, 2003, 16: 75-80.

245. Şener G, Şehirli AÖ, Şatıroğlu H, Keyer-Uysal M, Yeğen BÇ. Melatonin improves oxidative organ damage in a rat model of thermal injury. *Burns*, 2002, 28: 419-425.
246. Hagar HH, Abd El Tawab R. Cysteinyl leukotriene receptor antagonism alleviates renal injury induced by ischemia-reperfusion in rats. *Journal of surgical research*, 2012, 178: e25-e34.
247. Korkmaz GG, Uzun H, Cakatay U, Aydin S. Melatonin ameliorates oxidative damage in hyperglycemia-induced liver injury. *Clinical and Investigative Medicine*, 2012: E370-E377.
248. Mehaffey E, Majid DS. Tumor necrosis factor- α , kidney function, and hypertension. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 2017, 313: F1005-F1008.
249. Zakiyanov O, Kalousova M, Zima T, Tesaş V. Matrix metalloproteinases in renal diseases: a critical appraisal. *Kidney and Blood Pressure Research*, 2019, 44: 298-330.
250. Tan RJ, Liu Y. Matrix metalloproteinases in kidney homeostasis and diseases. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 2012, 302: F1351-F1361.
251. Novak KB, Le HD, Christison-Lagay ER, Nose V, Doiron RJ, Moses MA, Puder M. Effects of metalloproteinase inhibition in a murine model of renal ischemia-reperfusion injury. *Pediatric research*, 2010, 67: 257-262.
252. Bengatta S, Arnould C, Letavernier E, Monge M, de Préneuf HM, Werb Z, Ronco P, Lelongt B. MMP9 and SCF protect from apoptosis in acute kidney injury. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2009, 20: 787-797.
253. Lauhio A, Sorsa T, Srinivas R, Stenman M, Tervahartiala T, Stenman U-H, Grönhagen-Riska C, Honkanen E. Urinary matrix metalloproteinase-8,-9,-14 and their regulators (TRY-1, TRY-2, TATI) in patients with diabetic nephropathy. *Annals of medicine*, 2008, 40: 312-320.
254. Thrailkill KM, Bunn RC, Fowlkes JL. Matrix metalloproteinases: their potential role in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Endocrine*, 2009, 35: 1-10.
255. Urushihara M, Kagami S, Kuhara T, Tamaki T, Kuroda Y. Glomerular distribution and gelatinolytic activity of matrix metalloproteinases in human glomerulonephritis. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2002, 17: 1189-1196.
256. Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S, Ebihara I, Shimada N, Koide H. Elevation of serum levels of metalloproteinase-1, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and type IV collagen, and plasma levels of metalloproteinase-9 in polycystic kidney disease. *American journal of nephrology*, 2000, 20: 32-36.
257. Ling XB, Sigdel TK, Lau K, Ying L, Lau I, Schilling J, Sarwal MM. Integrative urinary peptidomics in renal transplantation identifies biomarkers for acute rejection. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2010, 21: 646-653.
258. Elster EA, Hawksworth JS, Cheng O, Leeser DB, Ring M, Tadaki DK, Kleiner DE, Eberhardt III JS, Brown TS, Mannon RB. Probabilistic (Bayesian) modeling of gene expression in transplant glomerulopathy. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 2010, 12: 653-663.
259. Fox C, Cocchiario P, Oakley F, Howarth R, Callaghan K, Leslie J, Luli S, Wood KM, Genovese F, Sheerin NS. Inhibition of lysosomal protease cathepsin D reduces renal fibrosis in murine chronic kidney disease. *Scientific reports*, 2016, 6: 1-15.
260. Cocchiario P, Fox C, Tregidgo NW, Howarth R, Wood KM, Situmorang GR, Pavone LM, Sheerin NS, Moles A. Lysosomal protease cathepsin D; a new driver of apoptosis during acute kidney injury. *Scientific reports*, 2016, 6: 1-15.
261. Ozkayar N, Piskinpasa S, Akyel F, Turgut D, Bulut M, Turhan T, Dede F. Relation between serum cathepsin D levels and endothelial dysfunction in patients with chronic kidney disease. *Nefrología (English Edition)*, 2015, 35: 72-79.

262. Yamamoto-Nonaka K, Koike M, Asanuma K, Takagi M, Trejo JAO, Seki T, Hidaka T, Ichimura K, Sakai T, Tada N. Cathepsin D in podocytes is important in the pathogenesis of proteinuria and CKD. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2016, 27: 2685-2700.
263. Roy S, Samanta K, Chakraborti T, Chowdhury A, Chakraborti S. Role of TGF-beta1 and TNF-alpha in IL-1beta mediated activation of proMMP-9 in pulmonary artery smooth muscle cells: involvement of an aprotinin sensitive protease. *Archives of biochemistry and biophysics*, 2011, 513: 61-69.
264. Cheng Z, Limbu MH, Wang Z, Liu J, Liu L, Zhang X, Chen P, Liu B. MMP-2 and 9 in chronic kidney disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18: 776.
265. Shi S, Lei S, Tang C, Wang K, Xia Z. Melatonin attenuates acute kidney ischemia/reperfusion injury in diabetic rats by activation of the SIRT1/Nrf2/HO-1 signaling pathway. *Bioscience reports*, 2019, 39.
266. Wanchai K, Yasom S, Tunapong W, Chunchai T, Thiennimitr P, Chaiyasut C, Pongchaidecha A, Chatsudthipong V, Chattipakorn S, Chattipakorn N. Prebiotic prevents impaired kidney and renal Oat3 functions in obese rats. *Journal of Endocrinology*, 2018, 237: 29-42.
267. Song X, Wang B, Lin S, Jing L, Mao C, Xu P, Lv C, Liu W, Zuo J. Astaxanthin inhibits apoptosis in alveolar epithelial cells type II in vivo and in vitro through the ROS-dependent mitochondrial signalling pathway. *Journal of cellular and molecular medicine*, 2014, 18: 2198-2212.
268. Pontes Andersen CC, Holmstrup P, Buschard K, Flyvbjerg A. Renal alterations in prediabetic rats with periodontitis. *Journal of periodontology*, 2008, 79: 684-690.
269. Ebaid H, Bashandy SA, Abdel-Mageed AM, Al-Tamimi J, Hassan I, Alhazza IM. Folic acid and melatonin mitigate diabetic nephropathy in rats via inhibition of oxidative stress. *Nutrition & metabolism*, 2020, 17: 6.
270. Derlacz RA, Sliwiska M, Piekutowska A, Winiarska K, Drozak J, Bryla J. Melatonin is more effective than taurine and 5-hydroxytryptophan against hyperglycemia-induced kidney-cortex tubules injury a. *Journal of pineal research*, 2007, 42: 203-209.
271. Winiarska K, Dzik JM, Labudda M, Focht D, Sierakowski B, Owczarek A, Komorowski L, Bielecki W. Melatonin nephroprotective action in Zucker diabetic fatty rats involves its inhibitory effect on NADPH oxidase. *Journal of pineal research*, 2016, 60: 109-117.
272. Stacchiotti A, Favero G, Giugno L, Lavazza A, Reiter RJ, Rodella LF, Rezzani R. Mitochondrial and metabolic dysfunction in renal convoluted tubules of obese mice: protective role of melatonin. *PloS one*, 2014, 9: e111141.
273. Agil A, Chayah M, Visiedo L, Navarro-Alarcon M, Rodríguez Ferrer JM, Tassi M, Reiter RJ, Fernández-Vázquez G. Melatonin Improves Mitochondrial Dynamics and Function in the Kidney of Zucker Diabetic Fatty Rats. *Journal of clinical medicine*, 2020, 9: 2916.
274. Promsan S, Lungkaphin A. The roles of melatonin on kidney injury in obese and diabetic conditions. *BioFactors*, 2020.
275. Leon J, Acuña-Castroviejo D, Sainz RM, Mayo JC, Tan D-X, Reiter RJ. Melatonin and mitochondrial function. *Life Sciences*, 2004, 75: 765-790.
276. Bazyar H, Gholinezhad H, Moradi L, Salehi P, Abadi F, Ravanbakhsh M, Javid AZ. The effects of melatonin supplementation in adjunct with non-surgical periodontal therapy on periodontal status, serum melatonin and inflammatory markers in type 2 diabetes mellitus patients with chronic periodontitis: a double-blind, placebo-controlled trial. *Inflammopharmacology*, 2019, 27: 67-76.

277. Renn TY, Huang YK, Feng SW, Wang HW, Lee WF, Lin CT, Burnouf T, Chen LY, Kao PF, Chang HM. Prophylactic supplement with melatonin successfully suppresses the pathogenesis of periodontitis through normalizing RANKL/OPG ratio and depressing the TLR 4/MyD88 signaling pathway. *Journal of pineal research*, 2018, 64: e12464.




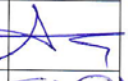


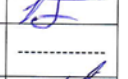
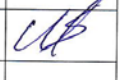


EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	: Büşra ÜNVER
Doğum Tarihi	: 01.01.1992
Doğum Yeri	: Silivri/İstanbul
Medeni Hali	: Bekar
Uyruğu	: T.C.
Adres	: Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Periodontoloji Anabilim Dalı, 53100, RİZE
Tel	: 0464 222 00 00-01
Faks	: 0464 222 00 02
E-mail	: bsraunverr@gmail.com
Eğitim	
Lise	: Hasan Sabriye Gümüş Anadolu Lisesi (2006-2010)
Lisans	: Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi (2010-2015)
Uzmanlık	: Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Periodontoloji Anabilim Dalı (2017-2021)
Yabancı Dil Bilgisi	
	İngilizce

EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU

T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU BAŞKANLIĞI ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI
(Republic of Turkey Recep Tayyip Erdogan University Local Ethics Committee for Animal Experiments)

BAŞVURU BİLGİLERİ (Application Information)	ETİK KURUL DOSYA NO(REFERENCE):26					
	ÇALIŞMANIN ADI	Deneysel Periodontitis İlişkili Sistemik Melatonin Tedavisinin Böbrek Dokusu Yapı ve Fonksiyonları Üzerindeki Etkileri				
	Title	Effects of Experimental Periodontitis-Associated Systemic Melatonin Treatment on Renal Tissue Structure and Functions				
	SORUMLU ARAŞTIRMACI (Director of Project)	Doç.Dr. Oğuz KÖSE				
	DİĞER GÖREVLİLER (Researchers)	Sevda KURT, Hatice YEMENOĞLU, Taha Emre KÖSE, Levent TÜMKAYA, Tolga MERCANTEPE, Kerimali AKYILDIZ, Büşra ÜNVER				
	BAŞVURULAN ETİK KURUL	Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu				
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	<input checked="" type="checkbox"/> Tek Merkez Ulusal	<input type="checkbox"/> Çok Merkezli Ulusal	<input type="checkbox"/> Çok Merkezli Uluslararası			
KARAR BİLGİLERİ	Karar No(Decision No):2019/24			Tarih (Date): 30.04.2019		
	R.T.E. Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi'nden, Doç.Dr. Oğuz KÖSE' nin sorumluluğunda yürütülen ve yukarıda başvuru bilgileri verilen Hayvan Deneyleri Araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler, araştırmanın gerekeçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına katılan üyelerin oy birliğiyle karar verilmiştir.					
Decision Information	The study above has been approved by the Local Ethics Committee of R.T.E.University.					
	<input checked="" type="checkbox"/> Accepted			<input type="checkbox"/> Rejected		
ÜYELER (Members)						
Ünvanı/ Adı/ Soyadı Ek Üyeligi	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof.Dr. Fikri BALTA (Başkan, Müdür)	Su Ürünleri (Veteriner Hekim)	R.T.E. Üniversitesi Su Ürünleri Fak.	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Doç.Dr. Levent TÜMKAYA (Başkan Vekili)	Histoloji Embriyoloji	R.T.E. Üniversitesi Tıp Fak.	E	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	-----
Doç.Dr. Ayşe ERTÜRK (Üye)	Enfeksiyon Hast. Ve Klinik Mikr.	R.T.E. Üniversitesi Tıp Fak.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Doç.Dr. Serkan GÜL (Üye)	Biyoloji	R.T.E. Üniversitesi Fen Edebiyat Fak.	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Doç.Dr.Kazım ŞAHİN (Üye)	Tıbbi Mikrobiyoloji	R.T.E. Üniversitesi Tıp Fak.	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Dr.Öğr.Üyesi Hatice SEVİM NALKIRAN (Üye)	Tıbbi Biyoloji	R.T.E. Üniversitesi Tıp Fak.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Dr.Öğr.Üyesi Medeni ARPA (Üye)	Tıbbi Biyokimya	R.T.E. Üniversitesi Tıp Fak.	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	-----
Dr.Öğr.Üyesi Murat ALKURT (Üye)	Protetik Diş Tedavisi	R.T.E. Üniversitesi Diş Hekimliği Fak.	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Şenay ÇAKIROĞLU (Üye)	Veteriner Hekim	R.T.E. Üniversitesi Deney Hay.Uy.ve Arş.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Şevket ÇAKMAKÇI (Üye)	Sağlık Çalışanı	Sendika Üyesi	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Rukiye ÜLGER (Üye)	Serbest Çalışan	Sivil Üye	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	

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

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