T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

STREPTOZOTOSİN İLE DİYABET OLUŞTURULMUŞ DENEYSEL PERİODONTİTİSLİ SIÇANLARDA İNSÜLİN VE ALFA-TOKOFEROL TEDAVİSİNİN SERUM SİTOKİN DÜZEYLERİ VE DİŞETİ iNOS VE CD95 EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİLERİ

Mükerrem HATİPOĞLU

DOKTORA TEZİ

PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Nilgün Özlem ALPTEKİN

KONYA-2011

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

STREPTOZOTOSİN İLE DİYABET OLUŞTURULMUŞ DENEYSEL PERİODONTİTİSLİ SIÇANLARDA İNSÜLİN VE ALFA-TOKOFEROL TEDAVİSİNİN SERUM SİTOKİN DÜZEYLERİ VE DİŞETİ iNOS VE CD95 EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİLERİ

Mükerrem HATİPOĞLU

DOKTORA TEZİ

PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Nilgün Özlem ALPTEKİN

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 09202002 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2011

ii. ÖNSÖZ

Projemizi desteklediği için Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Kordinatörlüğü'ne;

Çalışmamız boyunca bilgi ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocalarım S.Ü Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mustafa Cihat Avunduk, S.Ü Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Hasan Esen, S.Ü Meram Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı, Tıbbi İstatistik Bilim Dalı Bölüm Başkanı Prof. Dr. Said Bodur ve S.Ü. Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Seyfullah Haliloğlu'na

Doktora eğitimim boyunca üzerimde emeği bulunan başta danışman hocam Prof. Dr. Nilgün Özlem Alptekin olmak üzere değerli hocalarım Prof. Dr. Tamer Ataoğlu, Prof. Dr. Mihtikar Gürsel, Prof. Dr. İsmet Duran, Prof. Dr. İsmail Marakoğlu ve Doç. Dr. Sema Hakkı'ya

Her zaman yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen aileme ve nişanlıma;

Teşekkürlerimi sunarım.

iii.İÇİNDEKİLER Sayfa

SİMGELER ve KISALTMALAR vii

1. GİRİŞ 1

1.1.Periodontal Hastalık 1

1.2.Sitokinler 3

1.2.1.İnterlökin-1 4

1.2.2. İnterlökin-4 5

1.2.3. İnterlökin-6 7

1.3. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri 8

1.3.1. Nitrik Oksit ve İndüklenebilir Nitrik Oksit 11

1.3.2. Nitrik Oksitin Fizyolojik Kimyası ve Enflamasyondaki Rolü 13

Nitrik Oksitin pro-enflamatuvar özellikleri 15

Nitrik Oksitin anti-enflamatuvar özellikleri 15

1.3.3. Nitrik Oksit ve Periodontal Hastalık 19

1.4. Apoptozis 20

1.4.1. Fas (CD95)-Fas Ligand (CD95-L) İlişkisi 25

1.4.2. Fas (CD95) İlişkili Apoptozis 26

1.4.3. Apoptozis ve Periodontal Hastalık 27

1.4.4. Apoptozis, Nitrik Oksit ve Sitokinler 30

1.5. Sistemik Hastalıklar ve Periodontitis 32

1.6. Diyabet ve Periodontitis 33

1.6.1.Diyabet Tanımı ve Sınıflaması 33

1.6.2. Diyabetin Tanısı 36

1.6.3. Diyabetin Komplikasyonları ve Patogenezi 38

1.6.4. Diyabet ve Sitokinler 41

1.6.5. Diyabet ve ROT İlişkisi 42

AGE ile ROT üretimi 42
Polyol yolu 43
Protein Kinaz C aktivasyonu 44
MAP Kinaz aktiviteleri 44
1.6.6. Diyabet ve NO, iNOS Üretimi 44
1.6.7. Diyabet ve Apoptozis 46
1.6.8. Diyabet ve Periodontitis 47
Diyabet, Periodontitis ve Sitokin 49
Diyabet, Periodontitis ve iNOS Ekspresyonu 50
Diyabet, Periodontitis ve Apoptozis 50
1.6.9. Diyabet Tedavisi 50
1.6.10. Diyabet ve Antioksidanlar 52
1.7. Antioksidanlar ve E Vitamini 53
1.7.1. Diyabet Tedavisinde Yardımcı Olarak E Vitamini Kullanımı 58
1.7.2. Periodontitis ve Antioksidanlar 60
1.7.3. Diyabet, Periodontitis ve Antioksidanlar 62
2. GEREÇ ve YÖNTEM 64
2.1. Deney Hayvanları 64
2.2. Deneysel Çalışma Modeli 64
2.3. Histolojik ve İmmünohistokimyasal Analiz 66
2.3.1. Dokuların Hazırlanması 66
2.3.2. İmmünohistokimyasal İnceleme 67
2.3.3. Parametrelerin Değerlendirilmesi 67
2.4. Biyokimyasal Analiz 68
2.4.1 İnterlökin-1β..... 68
2.4.2. İnterlökin-4 69
2.4.3. İnterlökin-6 69

2.5. Verilerin İstatistiksel Analizi 70

3. BULGULAR 71

4. TARTIŞMA 80

4.1. Deneysel Hayvan Modeli 81

4.2. Alveoler Kemik Kaybı 81

4.3. Sitokinler 84

4.4. iNOS 87

4.5. CD95 90

5. SONUÇ ve ÖNERİLER 94

5.1. İnsülin Tedavisi 94

AKK ve serum sitokin konsantrasyonları 94

Dişeti iNOS pozitif hücre sayısı 94

Dişeti CD95 pozitif hücre sayısı 94

5.2. Alfa-tokoferol Uygulaması 94

AKK ve serum sitokin konsantrasyonları 94

Dişeti iNOS pozitif hücre sayısı 95

Dişeti CD95 pozitif hücre sayısı 95

6. ÖZET 98

7. SUMMARY 99

8. KAYNAKLAR. 100

9. EKLER 130

EK-A: Etik Kurul Kararı 130

10. ÖZGEÇMİŞ 131

iv. SİMGELER ve KISALTMALAR

ADA: Amerikan Diyabet Birliği “American Diabetes Association”

AGE: İleri glikozilasyon son ürünleri “advanced glycation end-products”

AKK: Alveoler kemik kaybı

ATP: Adenozin trifosfat

CRP: C-reaktif protein “C-reactive protein”

DM: Diabetes mellitus

DOS*:* Dişeti oluğu sıvısı

EDRF: Endotelden kaynaklanan gevşetici faktör “endothelium-derived relaxing factor”

eNOS: Endotelyal nitrik oksit sentaz

ERK: Hücre dışı sinyal düzenleyici kinazlar “extracellular signal-regulated kinases”

FADD: Fas ilişkili ölüm bölgesi “fas associated death domain”

Fas: CD95

HbA1: Hemoglobin A1

Ig: İmmünglobulin

IFN: İnterferon

iNOS: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz “inductible nitric oxide synthase”

JNKs: “c-Jun N- terminal kinases”

IL: İnterlökin

IP: İntra peritoniyal

MAPK: Mitojen aktive edici kinaz “mitogen activated protein kinase”

Min-Maks: Minimum-Maksimum

NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

NO^{-}_{3}: Nitrat

NO: Nitrik oksit “nitric oxide”

NO^{-}: Nitroksil anyonu

$ONOOCO_2^{-}$: Nitrosoperoksi karbonat

NO_2: Nitrojen dioksit

N_2O_3: Dinitrojen trioksit

NOS: Nitrik oksit sentaz “nitric oxide synthase”

nNOS: nöronal nitrik oksit sentaz

NFκB: “Nükleer Faktör κB”

O_2^{-}: Süperoksit anyon radikali

$ONOO^-$: Peroksinitrit anyonu

ONOOH: Peroksinitröz asit

Ort: Ortalama

PKC: Protein Kinaz C

RAGE: AGE reseptörü “receptor of AGE”

RNT: Reaktif nitrojen türleri “reactive nitrogen species”

ROT: Reaktif oksijen türleri “reactive oxygen species”

Ss: Standart sapma

STZ: Streptozotosin

Th: T yardımcı “T helper”

Thp: öncü T yardımcı “T hepler progenitor”

TNF: Tümör nekroz faktör

TNFR: Tümör nekroz faktör reseptör

1.GİRİŞ

1.1.Periodontal Hastalık

Gingivitis, diş ve dişeti arasına yerleşen mikrobiyal biyofilm ve konak arasındaki etkileşim sonucunda gelişen, sadece dişetini etkileyen, kızarıklık "hiperemi", şişlik "ödem" ve kanama ile karakterize geri dönüşümü olabilen enflamatuvar bir hastalıktır. Periodontitis, bakteriyel etkiler sonucunda dişetinde başlayan iltihabi değişimlerin dişi destekleyen dokulara yayılarak alveoler kemikte yıkım, cep derinliği artışı, ataşman kaybı, mobilite ve tedavi edilmezse diş kaybı ile sonuçlabilen geri dönüşümsüz kronik enflamatuvar bir hastalıktır. Dental plak birikimi sonrasında gingivitis gelişebilirken, her gingivitis periodontitise dönüşmeyebilir (Flemmig 1999, Mariotti 1999).

Periodontal hastalıkların bakteriler tarafından oluşturulduğu fikri ilk olarak 1882 yılında Witzel tarafından ileri sürülmüş ve 1890 yılında Miller "micro-organisms of the human mouth" isimli yayınında ağız boşluğundaki bakterileri sınıflara ayırmış ve bu bakterilerin çürüklere ve periodontal hastalıklara sebep olduğunu bildirmiştir (Gold 1985). Yapılan ilk çalışmalarda periodontitisin okluzal travma, kullanılmama atrofisi, yapısal bir defekt veya bunların bir kısmının birlikte bulunmasından kaynaklandığı, mikroorganizmaların ise periodontal doku yıkımına daha sonra dahil oldukları düşünülüyordu. "plak evangelistleri" olarak adlandırılan bir grup klinisyen 1950'li yılların ortalarında periodontal hastalıktan korunma ve tedavisinde plak kontrolünün önemini vurgulamaktaydı (Socransky ve Haffajee 2003). Miller tarafından ortaya atılan "non-spesifik plak hipotezi"'ne göre dental plak içerisinde bulunan tüm mikroorganizmaların eşit şekilde periodontal hastalığa sebep olabildiği ve periodontitisin dental plak miktarının artışı ile ilişkili olduğu kabul ediliyordu (Gold 1985). Walter Loesche 1976 yılında "spesifik plak hipotezi"ni ortaya atmıştır. Bu hipotez plağın patojenitesinin içinde bulunan çeşitli spesifik mikroorganizmaların varlığına ve bunların sayılarının artmasına bağlı olduğunu ileri sürmektedir (Socransky ve Haffajee 2003). Periodontal hastalığa yatkın bir bireyde pek çok şüpheli periodontopatojen hastalığı başlatma ve sürdürme gücüne sahip görünmektedir (Flemmig 1999, Haffajee ve ark 2008). Biyofilm sadece oral kavitede değil bütün sert ve yumuşak dokular üzerinde oluşabilen, biyolojik olarak yayılan çoğu sıvı ve yarı sıvı çevrede, endüstriyel ve çevreye ait sistemlerde görülebilen

glukoprotein içerikli bir yapıdır (Wirthlin ve ark 2003, Bernimoulin 2003). Dental çürük ve periodontal hastalıkların temel etiyolojik ajanı olan mikrobiyal biyofilm, içeriğinde bulunan mikroorganizmalar arasındaki sinerjistik etkileşim sonucunda daha organize yapılara dönüşebilir (Kuramitsu ve ark 2005).

"Başlangıç lezyon" daha önceden temizlenmiş dişler üzerinde plak birikimini takiben 2-4 gün içinde oluşur. Başlangıç lezyon dişeti bölgesine gelen kemotaktik ve antijenik maddelere karşı oluşan bir cevaptır. Subgingival plak birikimini takiben iki gün içinde özellikle lipopolisakkarit'ler olmak üzere bakteriye ait hastalık yapıcı özellikler "virülans faktörleri" epitel hücrelerinin yüzey reseptörleri ile etkileşime girer. Daha sonra bakteri ve/veya ürünleri dişeti bağ dokusuna doğru geçebilir (Carranza ve ark 2007).

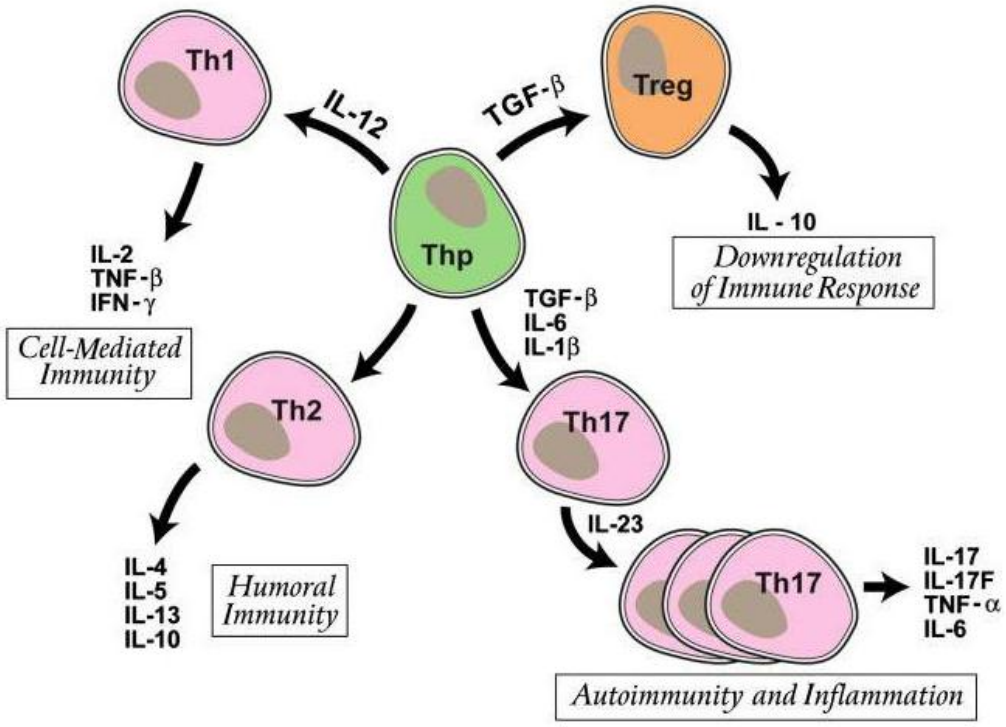
"Erken lezyon" başlangıç lezyonundan sonra gelişir ancak ikisini birbirinden ayıran kesin bir çizgi yoktur. Erken lezyon başlangıç lezyonunun olduğu bölgede plak birikiminin başlamasından 4-7 gün sonra ortaya çıkar. Birleşim epiteli ve dişeti oluğunda lökosit sayısı artmıştır ve bölgeye komşu bağ dokusunda lenfosit birikimi vardır. Birleşim epiteli altında infiltre bağdokusu bölgesinde fibroblastlarda değişiklikler oluşur ve kollajen yıkımı gerçekleşir. Bölgedeki hücreler ağırlıklı olarak lenfositlerden oluşur ve az sayıda plazma hücresi içerir (Carranza ve ark 2007).

Plak birikimi devam ederse; gingivitisin klinik belirtileri görülmeye başlar ve "erken lezyon" "yerleşmiş lezyon" haline gelir. Dişeti oluğundaki plak birikimi devam ettikçe bağ dokusundaki iltihabi cevap şiddetlenir. Yerleşmiş lezyonda, lenfosit, makrofajlar ve plazma hücreleri daha da yoğunlaşarak interlökin (IL)-1, tümör nekroz faktör (TNF)-α gibi sitokinler, IL-8, interferon (IFN), kemokin, lenfokin, enzim ve diğer iltihabi ürünlerde artış görülür. Matriks metalloproteinaz gibi kollajen yıkıcı belirteçler "mediyatör" de artarak bağ dokusunda önemli miktarda yıkım gerçekleşir, ancak henüz alveoler kemik kaybı yoktur. Bu süreçte birleşim epiteli cep epiteline dönüşmeye başlayarak iltihabın alveoler kemiğe yayılması "ilerlemiş lezyon" olarak adlandırılır ve bu aşama periodontal yıkımı ifade eder (Carranza ve ark 2007).

1.2. Sitokinler

Sitokinler, molekül ağırlığı 8-40.000 Da arasında değişen, hücreler arası etkileşimlerde mesaj iletici olarak görev yapan, immün sistem hücreleri ve vücuttaki diğer hücreler tarafından salgılanabilen, glikoprotein yapıdaki maddelerdir (Dinarello 2000). Hücre çoğalması, büyümesi, aktive edilmesi, iltihap, immünite ve tamir gibi durumlarda düzenleyici etkileri vardır (Wolf 2007). Sitokinler; lenfositlerden salındığı zaman lenfokin, monosit ve makrofajlardan salındığı zamanda monokin adını alır. Kemotaksiste etkili olanlarına kemokin, tek bir lökosit tarafından üretilen ve diğer lökositler üzerinde etkili olanlara ise interlökin denir (Dinarello 2000, Kinane ve ark 2003). CD4+ T yardımcı "T helper" (Th) hücreleri farklı tipteki immün cevapları düzenleyen ve farklı sitokinler salgılayan fonksiyonel alt gruplara ayrılırlar (Resim 1.1). Öncü "projenitör" (Thp) hücreleri, IL-12 varlığında Th1, IL-4 varlığında ise Th2 hücrelerine farklılaşırlar (Yamazaki ve ark 1995, Gemmell ve ark 1997, McGuirk ve ark 2010). Hücresel bağışıklıkta etkili olan IL-2, TNF-β ve IFN-γ gibi sitokinler Th1 hücrelerinden salgılanırken, hümoral bağışıklılıkta rol oynayan IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 ise Th2 hücrelerinden üretilir (Gaffen ve Hajishengallis 2008). Yardımcı öncü T hücrelerinden IL-1β, IL-6, TGF-β aracılığıyla Th17 hücreleri, IL-23 varlığında ise Thp17 hücrelerinden IL-6, TNF-α, IL-17, IL-21, IL-22, IL-26 salgılanır. İnterlökin-10 ve TGF-β üretimini düzenleyici T "regulatory T cells" hücreleriyle Thp-17 arasındaki antagonistik etki nedeniyle Thp17 hücreleri düzenleyici T hücrelerinin üretimini baskılar (Kramer ve Gaffen 2007). Endotel hücreleri ve fibroblastlardan köken alan sitokinlerin bir kısmı enflamasyonun ilerlemesine sebep oldukları için "pro-enflamatuvar sitokin"ler, bazıları da enflamasyonu baskılayıcı özellikleri nedeniyle "anti-enflamatuvar" sitokin"ler olarak tanımlanır (Thomson 1998, Wolf 2007). İnterlökin-1β, IL-6, TNF-α pro-enflamatuvar etki gösterirken, B-lenfositlerin esas uyarıcıları olan IL-4, IL-10 ve IL-13 gibi sitokinler anti-enflamatuvar özelliği ile IL-1, TNF ve kemokinler gibi pro-enflamatuvar sitokinleri kodlayan genleri baskılama yeteneğine sahiptirler. İnterferon-γ ise antiviral aktiviteye sahip, TNF aktivitesini ve nitrik oksit sentezini arttıran pro-enflamatuvar bir sitokindir. Hormon benzeri peptit özelliği ile yerel "lokal" veya kan dolaşımına girerek "sistemik" etki gösterirler. İltihabi hastalıklara karşı konak savunmasında etkin olan sitokinler dengesiz ve aşırı üretimleri nedeniyle zararlı etki gösterebilir (Dinarello 1996, Dinarello 2000, Wolf 2007). Sitokinler aşırı

duyarlılık reaksiyonları gibi immonolojik olaylarda düzenleyici olarak rol oynarlar. Savunma sistemi hücrelerinin gelişme ve farklılaşmalarını, fonksiyonlarını etkileyerek, konağın yabancı antijenlere ve zararlı etkenlere karşı cevaplarını düzenler (Seymour ve Gemmell 2001).



Resim 1.1. Öncü Th hücrelerinin farklılaşması (Kramer ve Gaffen 2007).

1.2.1. İnterlökin-1

İnterlökin-1 pro-enflamatuvar bir sitokindir. Aktive olmuş makrofajlardan, lenfositler tarafından üretilirken aynı zamanda mast hücreleri, fibroblastlar, keratinositler ve endotelyal hücreler tarafından mikroorganizmalar, bakteriyel toksinler, kompleman faktörleri veya doku yaralanmasına cevap olarak üretilmektedir. İnterlökin-1, IL-1β ve IL-1α olmak üzere iki aktif formda bulunur (Lo ve ark 1999, Carranza 2007, Arend ve ark 2008). İnterlökin-1β ve IL-1α'nın öncü "precursor" formları 31 kDa moleküler ağırlığa sahiptir, olgunlaşmış formlarına dönüşümü için 17 kDa spesifik hücresel proteazlara ihtiyaç vardır. İnterlökin-1'in tip-I ve tip-II olmak üzere iki çeşit reseptörü vardır: Tip-I reseptör daha aktif olarak görev yaparken tip-II reseptör işlev görmez (Thomson 1998). Enflamasyonda lökositlerin aktivasyonunda, damar geçirgenliğinin düzenlenmesinde ve kemik yıkımının arttırılmasında etkin olan IL-1'in aktiviteleri IL-1 reseptör antagonisti

tarafından baskılanır (Dinarello 1996, Dennison ve Van Dyke 1997, Hedayat ve ark 2010). Ayrıca, IL-1β, prostoglandin, kollejenaz ve proteaz üretimini arttırarak da periodontal dokuların kaybında etkili olabilir (Stashenko ve ark 1991a, Hirose ve ark 2001). İnterlökin-1, TNF-α ile sinerjistik etki göstererek kemik demineralizasyonunda etkili olurken (Gemmell ve ark 1997, Van der Zee ve ark 1997), osteoblastları uyararak IL-6, TNF-α gibi pro-enflamatuvar sitokinleri üretir (Hughes ve ark 2006). Ayrıca, osteoblast kökenli hücrelerin farklılaşmalarının erken aşamalarındaki hücrelerin proliferasyonunu uyarır, ancak tam farklılaşma durumunda fonksiyonlarını baskılar (Schwartz ve ark 1997). İnterlökin-1, IL-6, TNF-α gibi pro-enflamatuvar sitokinler doku yaralanmasının olduğu yerlerde çeşitli hücrelerden salınırlar. Bunlar ilk olarak dolaşımdaki lökositlerin toplanmasını kolaylaştıran adhezyon moleküllerinin ekspresyonunu, sonrasında kemik iliğinden lökosit ve trombositlerin dolaşıma geçmesini sağlar ve son olarak da plazma proteinlerinin hepatik veya endotelyal salınımını değiştirerek kardiovasküler hastalık riskini arttırır (Lowe 2001). Şiddetli periodontitis hastalarında periodontal terapi öncesi ve sonrasında serum IL-1β düzeyinin değişmediği gözlenmiştir (Behle ve ark 2009). Sağlıklı ve çeşitli derecelerde enflamasyonu olan bireylerden alınan dişeti biyopsileri incelendiğinde enflamasyon derecesi arttıkça IL-4 miktarının azaldığı, IL-6 ve IL-1β seviyelerinin arttığı gözlenmiştir (Ejeil ve ark 2003). Bununla birlikte periodontal yıkım olan bölgelerdeki DOS IL-1 ve IL-6 düzeylerinin sağlıklı bölgelere kıyasla daha yüksek olduğu ve IL-4 düzeylerinin IL-1 ve IL-6 ile zıt etki gösterdiği rapor edilmiştir (Giannopoulou ve ark 2003b).

1.2.2. İnterlökin-4

İnterlökin-4'ün anti-enflamatuvar bir sitokindir. Memeli hücrelerinde rekombinant IL-4 protein ekspresyonu 15, 18 ve 19 kDa olmak üzere üç farklı molekül ağırlığı göstermektedir (Thomson 1998). İnterlökin-4, mast hücreleri, bazofiller ve T hücreleri tarafından üretilir ve antijen spesifik B hücrelerinin klonal ekspansiyonunda önemli bir faktördür. İnterlökin-2 reseptörlerini azaltarak IL-2 ile uyarılan bazı aktiviteleri baskılar: IL-2'ye bağlı doğal öldürücü hücre "natural killer"lerin düzenleyerek, ve IFN-γ'ya bağlı makrofaj aktivasyonu ve bunun anti-enflamatuvar etkisinin baskılayarak bağışıklık sisteminin olumsuz yönde düzenlenmesine katkıda bulunur. İnterlökin-4'ün, B ve T hücre proliferasyonunu

uyarmak, CD4+T hücrelerinin Th2 hücrelerine farklılaşmasını sağlamak, hümoral ve kazanılmış immünite ve allerjik cevabın gelişiminde anahtar rol oynamak gibi birçok biyolojik görevi vardır (Dennison ve Van Dyke 1997, Gemmell ve ark 1997). İnterlökin-4, immünglobulin (Ig) E aracılığı ile hücre yüzeylerinde bulunan IgE reseptörlerinin "up-regülasyonu"nu sağlayarak immün cevabı güçlendirir. B lenfositleri ve mononükleer fagositik hücrelerde düşük "affinite"li, mast hücreleri ve bazofillerde yüksek "affinite"li IgE reseptörleri vardır (Gemmell ve ark 1997, Pawankar ve ark 1997). Ancak, *in-vitro* şartlarda IL-4'ün IL-10 ile birlikte olduğu durumlarda IgE düzeyini azalttığı rapor edilmiştir (Jeannin ve ark 1998). Ayrıca, IL-4'ün reaktif oksijen türleri "reactive oxygene species" (ROT), reaktif nitrojen türleri "reactive nitrogene species" (RNT) ve prostaglandinler gibi diğer pro-enflamatuvar belirteç "medyatör"lerin üretimini baskıladığı rapor edilmiştir (Bogdan ve ark 1994). Literatürde, IL-4'ün alınan örnek bölgesine göre farklı düzeylerde tespit edildiğini saptayan çalışmalar vardır (Górska ve ark 2003, Bastos ve ark 2009, Buhlin ve ark 2009). Górska ve ark (2003) IL-4 düzeyinin enflamasyonlu dişetinde, sağlıklı dişeti dokusuna oranla daha düşük olduğunu belirtilmiştir. Diğer taraftan, agresif periodontitis teşhisi konulmuş hastalarda DOS total IL-4 düzeyinin yıkım olan ve olmayan bölgelerde benzer düzeylerde olduğu ancak sağlıklı kontrol alanlarında IL-4 konsantrasyonunun daha yüksek bulunduğu rapor edilmiştir (Bastos ve ark 2009). Ayrıca, plazma örneklerindeki IL-4 seviyesinin periodontitisle ilişkili olarak azalma gösterdiği tespit edilmiştir (Buhlin ve ark 2009). Diğer yandan şiddetli periodontitis hastalarında periodontal terapi öncesi ve sonrasında serum IL-4 düzeylerinin değişmediği gözlenmiştir (Behle ve ark 2009). Sitokinleri kodlayan genler ve periodontal hastalık arasında ilişkinin araştırıldığı çalışmalarda çelişkili sonuçlar rapor edilmiştir (Papapanou ve ark 2001, Caffesse ve ark 2002, Trevilatto ve ark 2002, Jepsen ve ark 2003, Scarel-Caminaga ve ark 2004, Donati ve ark 2005, Babel ve ark 2006, Nikolopoulos ve ark 2008). Literatürde IL-4 polimorfizmi ile kronik periodontitis (Holla ve ark 2008, Anovazzi ve ark 2010) ve agresif periodontitis (Gonzales ve ark 2007) arasında ilişki olduğunu gösteren çalışmalar olmasına karşın, polimorfizmin kronik (Donati ve ark 2005) ve agresif periodontitis (Gonzales ve ark 2004) etyopatogenezinde tek başına etkili olmadığını saptayan çalışmalar da vardır. Sigaranın IL-4 düzeyi üzerine etkisini değerlendiren çalışmalarda farklı sonuçlar rapor edilmiştir. Periodontal olarak sağlıklı bireylerde DOS IL-4 total miktarının sigara içen bireylerde daha düşük olduğu, şiddetli doku yıkımı olan bireylerde ise

sigaranın DOS IL-4 miktarını arttırdığı saptanmıştır (Kamma ve ark 2004). Deneysel gingivitis varlığında sigaranın DOS IL-4 total miktarını azalttığı gösterilmiştir (Giannopoulou ve ark 2003a). Serum IL-4 konsantrasyonunun sigara içen hastalarda daha yüksek düzeyde olduğu bulunmuştur (Byron ve ark 1994). Kronik ve agresif periodontitisli diyabetik olan ve olmayan hastalarda serum IL-4 düzeylerinin periodontal tedavi öncesi ve sonrasında önemli değişim göstermediği saptanmıştır (Correa ve ark 2010, Duarte ve ark 2010).

1.2.3. İnterlökin-6

İnterlökin-6, immün cevap, akut faz reaksiyonları ve hemaptozis gibi bir çok görevi olan "multifonksiyonel" özellik gösteren pro-enflamatuvar bir sitokindir. İnterlökin-6 26-kDa protein olarak da adlandırılmaktadır (Thomson 1998, Hedayat ve ark 2010). İnterlökin -6 reseptörü 80-kDa bağlı protein ve sinyal dönüştürücü 130-kDa olmak üzere iki molekülden oluşur (Thomson 1998). İnterlökin-6, makrofajlar, monosit T ve B lenfositler, fibroblastlar, endotel hücreleri, epitel hücreleri, kemik hücreleri, mast hücreleri, nöron hücreleri, osteoblastlar, langerhans hücreleri, pankreas β hücreleri, dentritik hücreler ve keratinositleri içine alan çok yaygın bir hücre grubu tarafından üretilirler. Ayrıca, B lenfositlerin farklılaşmasında, T lenfositlerin proliferasyonunda, B lenfositlerden antikor üretiminde, akut faz protein sentezinin stimülasyonunda, kompleman sisteminin aktivasyonunda rol oynadığı bilinmektedir (Dennison ve Van Dyke 1997). Yardımcı T hücrelerinin Th17'ye dönüşümünde rol alır ve sonrasında Th17 tarafından da üretilir (Gaffen ve Hajishengallis 2008). İnterlökin-6 fibroblastların IL-2 salınımını uyarır ve B hücrelerininde farklılaşmasına öncülük eder (Dennison ve Van Dyke 1997). İnterlökin-6, "lenfoid" olan ve olmayan hücreler tarafından üretilir, "pre-aktif" fare ve insan B hücrelerinde Ig üretimini arttırır ve sonunda olgunlaşmalarını "maturasyon"larını sağlayarak yüksek düzeyde Ig sentezleyen hücreler haline gelmesini sağlarlar. İnterlökin-6, osteoklast farklılaşmasının uyarırken IL-1β, TNF-α, lenfotoksin, prostaglandinler ve diğer araşidonik asit metabolitleriyle birlikte kemik yıkımına katkıda bulunur (Franchimont ve ark 1997, Bozkurt ve ark 2000, Naka ve ark 2002, Gemmell ve ark 1997, Schwartz ve ark 1997). Periodontal yıkım olan bölgelerdeki DOS IL-6 düzeylerinin sağlıklı bölgelere oranla daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Giannopoulou ve ark 2003b). Kronik periodontitis hastalarında

periodontal tedavi öncesi ve sonrasında DOS IL-6 düzeylerinin değişmediği rapor edilmiştir (Erdemir ve ark 2007). Serum IL-6 düzeylerinin değerlendirildiği çalışmalarda, periodontal tedaviden sonra serum IL-6 ve C-reaktif protein (CRP) düzeylerinin azaldığı saptanırken (Shimada ve ark 2010), diğer bir araştırmada herhangi bir değişimin olmadığı tespit edilmiştir (Behle ve ark 2009). Periodontal dokuların enfeksiyonunda ve vücut ağırlığı artışında IL-6'nın etkili olabileceği bulunmuştur (Saxlin ve ark 2009). Ayrıca, IL-6 polimorfizmi ve periodontitis arasında ilişki olduğuda rapor edilmiştir (Franch-Chillida ve ark 2010).

Periodontal doku kaybında etkili olan enflamatuvar belirteçlerin kemik yıkımı için uygun konsantrasyonlara ulaşması IL-1, IL-6, IL-11, IL-17 ve TNF-α gibi pro-enflamatuvar sitokinlerin salınımına bağlıdır. Diğer taraftan, IL-4, IL-10, IL-12, IL-13, IL-18, IFN-β ve IFNγ gibi anti-enflamatuar sitokinler ise kemik yıkımını baskılayıcı etki gösterirler (Lerner ve ark 2006). Periodontal tedavi sonrası IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12 gibi pro-enflamatuvar sitokin seviyelerinin azaldığı rapor edilmiştir (Thunell ve ark 2010).

1.3. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri

Serbest radikaller, bir veya daha faza çiftlenmemiş elektron içeren, bağımsız türler olarak tanımlanır. Bu radikaller doğası gereği oldukça reaktif ve farklı türler olup, elektronları çıkarma yeteneğine sahip, hücre ve doku fonksiyonları için canlı "vital" olan çeşitli biyomolekülleri okside edebilme kapasitesinde olan ürünlerdir. Ayrıca, bu türler sadece serbest oksijen radikallerini değil, nitrojen ve klorin türlerini de içerirler (Chapple ve Matthews 2007). Reaktif oksijen türleri teriminin daha populer olmasının sebebi, gerçek radikal olmayıp ancak hücre içi ve dışında radikal formasyonu yeteneğine sahip diğer reaktif türleri kapsamasından dolayıdır (Chapple ve Matthews 2007).

Antioksidanlar, düşük konsantrasyonlarda bulunup, oksidize olabilen bir substrat ile karşılaştırıldığında, bu substratın oksidasyonunu baskılayabilen ya da erteleyebilen maddeler olarak tanımlanır. Oksidatif stres, pro-oksidan antioksidan dengesinde, pro-oksidan lehine dengenin bozulup hasar oluşması olarak tanımlanır. Redoks potansiyeli, bir maddenin hidrojene nispeten elektronlara olan ilgisinin "affinite" ölçüsü olarak tanımlanır (Chapple ve Matthews 2007).

İnsanlar dahil bütün oksijenli solunum yapan canlılar için moleküler oksijen, elektron transport sistemlerinin son elektron alıcısı "acceptor" olduğu için ve adenozin difosfattan, adenozin trifosfat (ATP) elde edilen canlılık durumunda oksijen yaşam için zorunludur (Nagano 2009). Toplam ATP üretiminin %90-95'i bu şekilde gerçekleşir. Normal koşullar altında küçük bir yüzdeyle oksijen bir, iki veya üç elektron indirgenebilir ve sonuçta sırasıyla süperoksit anyon, hidrojen peroksit, hidroksil radikali oluşabilir. Mitokondri ayrıca "nitrik oksit", "nitroksil" anyon ve "peroksinitrit" üretme yeteneğine sahiptir (Cutando ve ark 2007).

Serbest radikaller atomik veya moleküler orbitallerinde bir ya da daha fazla çiftleşmemiş elektrona sahip molekül veya molekül parçalarıdır. Serbest radikaller ve onların radikal olmayan metabolitleri olan ROT oldukça yıkıcı olabilmektedir (Cutando ve ark 2007). Normal hücresel metabolizmanın ürünleri olan ROT ve RNT hem zarar hem de fayda yönünde ikili bir role sahiptir. Reaktif oksijen türlerinin faydalı etkileri düşük ve orta düzeydeki konsantrasyonlarda ortaya çıkar. Çeşitli enfeksiyon ajanlarına karşı savunmada ve birçok hücresel sinyal sistemlerinin fonksiyonunda fizyolojik rolleri vardır ve bu konsantrasyonlarda mitojenik cevabı indükler. Serbest radikallerin neden olduğu potansiyel biyolojik hasar "oksidatif stres" ve "nitrosatif stres" olarak adlandırılır ve biyolojik sistemlerde ROT/RNT aşırı üretildiğinde ve enzimatik ve nonenzimatik antioksidanlarda eksiklik olduğunda meydana gelir (Valko ve ark 2007).

Reaktif oksijen türlerini oluşturan dışsal kaynaklar içerisinde; 1) Isı, 2) travma, 3) ultrason, 4) ultraviole ışık, 5) ozon, 6) sigara içme, 7) egsoz dumanı, 8) radyasyon, 9) enfeksiyon, 10) aşırı egzersiz ve 11) terapötik ilaçlar mevcuttur. İçsel kaynaklar ise: 1) süperoksit oluşturan mitokandrial elektron transport sistemlerinden elektron kaçması, "bi-product of metabolic pathways", 2) konak savunma hücreleri (fagositler) ve bağdokusu hücrelerinin (osteoklast, fibroblast) fonksiyon görmesi olarak sıralanabilir (Chapple ve Matthews 2007).

Fagositik lökositlerin (nötrofiller, eosinofiller, monosit ve makrofajlar) temel görevi mikroorganizmaları ortadan kaldırmaktır. Bunun için bu hücreler bol miktarda toksik ROT'yi üretme yeteneğine sahiptir. Normal hücresel metabolizmada bu türler bol miktarda üretilir; enflamasyonda ise önemli derecede artış gösterir (Conner ve ark 1996). Sağlıklı dişeti ve periodontal ligamentte bol miktarda bulunan

fibroblastlar kültürde tespit edilebilecek düzeyde kendiliğinden ROT üretebilme yeteneğindedir (Chapple ve Matthews 2007). Reaktif oksijen türleri ve antioksidanlar arasında bir denge vardır. Eğer bu denge ROT lehine hafif bir eğilim gösterirse oksidatif stres düşük düzeyde olur. Bu hafif değişim NFκB ve aktive edici protein-1 gibi gen yazılım faktörlerini uyarır ve bunlar pro-enflamatuvar sitokinlerin sentezini arttırarak enflamasyonun şiddetlenmesine neden olup, dolaylı olarak doku hasarına neden olur. Redoks durumu antioksidanlar lehine değişirse antioksidanlar bu gen yazılım faktörlerini baskılar ve enflamasyonu azaltır. Yüksek konsantrasyonlardaki ROT doğrudan doku hasarına yol açabilir (Chapple 2006). Reaktif oksijen türleri hücresel yapıların, nükleik asitlerin, lipid ve proteinlerin hasarlanmasında rolü olabilir. Hidroksil radikalinin DNA molekülünün bütün komponentleriyle reaksiyona girdiği bilinmektedir. Yalnızca DNA ile değil oksidasyona oldukça duyarlı fosfolipitlerin doymamış "poliansature" yağ asiti kalıntılarıyla da reaksiyona girerler. Peroksil radikalleri bir kez oluştuğunda sonucunda malondialdehid oluşan peroksidasyon süreci başlar. Malondialdehid, bakteri ve memeli hücrelerinde mutajenik, sıçanlarda ise karsinojeniktir. Proteinlerin aminoasit kalıntılarının zincir tarafında özellikle sistein ve metionin kalıntıları oksidasyondan etkilenirler (Valko ve ark 2007). Doku yıkımının fizyolojik baskılayıcısı olan α-1-antitripsin periodontitisle yakından ilişkilidir. Bu molekül nötrofil elastazın temel inhibitörüdür ve serbest radikaller bu molekülü inaktive edince elastaz aktivitesi ile dolaylı olarak doku hasarı meydana gelir (Chapple 2006). Ayrıca, α-1 antitripsin'nin oksidasyonu, nükleer faktör (NF)-κB aracılığıyla monosit ve makrofajlarda pro-enflamatuvar sitokinlerin salınımını arttırarak yıkıcı bir etkinin ortaya çıkmasına neden olur (Sharma ve Pradeep 2006).

İki temel endojen ROT kaynağı vardır: 1) Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz ve 2) mitokondri. Birçok hücrede Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz patojenlere karşı oluşturulan savunma sisteminde veya hücresel sinyal gibi önemli fizyolojik cevaplarda ROT'ların temel kaynağıdır. Bir diğer kaynak olan mitokondri de elektron transport zincir kompleksleri arasından transferle ROT oluşturulur. Ayrıca, farklı hücre tiplerinden ksantin oksidazlar, siklooksijenazlar, lipoksijenazlar, myeloperoksidazlar, hem oksijenazlar, mono amino oksidazlar, aldehit oksidazlar, sitokrom P450 temelli enzimler yoluyla ROT üretilir (Pourova ve ark 2010). Reaktif oksijen türleri özellikle süperoksit anyonu (O_2^-), aktive olmuş

nötrofillerde nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz (NADPH) enzimi tarafından büyük oranda sentezlenir. Süperoksit anyonundan hidrojen peroksit, hipoklorik asit, hidroksil radikalleri ve nitröz oksit gibi diğer radikaller üretilir. Süperoksit, osteoklastların boşluğa bakan buruşuk yüzeyinde lokalize olarak osteoklast ilişkili kemik yıkımına katıda bulunurlar (Sharma ve Pradeep 2006, Chapple ve Matthews 2007).

Nötrofiller tarafından ROT üretimi için minimum oksijen basıncı yaklaşık %1 ve ph 7,0-7,5 olmalıdır. Bu koşullar periodontal cep içinde mevcut olduğundan, kronik veya aşırı ROT üretiminin periodontal doku hasarında önemli olabileceği ileri sürülmektedir. Reaktif oksijen türleri *in vitro* olarak değişik derecelerde tip-1 kollajen üzerinde proteoliz eğilimini artırmak yönünde etki gösterirler. Kollajenin yüksek pirolin/hidroksipirolin içeriğinden dolayı ROT'lerdan etkilenmesi kolaydır. Kollajen metabolitlerinin DOS içindeki varlığı konak ve bakteri kollajenazları tarafından proteolizis sonucunda olabilirken, oksidatif hasar doğrudan ya da dolaylı olarak bu üretime katkıda bulunabilir. Reaktif oksijen türlerinin kemik yıkımı üzerine etkileri çalışılmamasına karşın osteoklastları aktive ettiği, osteoklast oluşumunu arttırdığı gösterilmiştir. Osteoklastların ürettiği ROT'ların yıkımda doğrudan rol oynadığı söylenmektedir (Chapple ve Matthews 2007).

Reaktif oksijen türleri programlanmış hücre ölümü olan apoptoziste de rol oynarlar. Mitojenle aktive edilmiş "c-Jun N- terminal kinases" (JNK), "p38", hücre-dışı sinyal düzenleyici kinaz "extracellular signal-regulated kinase" (ERK) gibi proteinkinazlar oksidatif stresle indüklenmiş apoptotik süreçte önemli rol oynarlar. Oksidatif stresle aktive olduğunda JNK ve p38 proapoptotik, ERK ise antiapoptotik faktör olarak rol oynar. JNK aktivasyonu apoptosis için önemli aşamalardan biridir. Apoptosisi düzenleyen önemli proteinlerde biri olan Bcl-2 ailesi yoluyla ve mitokondriden apoptotik faktör sitokrom-c salınımının uyarılmasıyla ROT'lar hücre ölümüne katkıda bulunabilirler (Pourova ve ark 2010).

1.3.1. Nitrik Oksit ve İndüklenebilir Nitrik Oksit

Reaktif nitrojen türlerinin fazla üretilmesi "nitrosatif stres" olarak tanımlanır. Bu reaktif nitrojen metabolitlerinin fazla üretildiğinde ve nötralize edilemediğinde meydana gelir (Valko ve ark 2007). Son zamanlarda kardiovasküler sistem, sinir

sistemi ve immün sistemde her zaman her yerde bulunabilen mesaj molekülü olarak nitrik oksit (NO) gibi ve nitratif stresi indükleyen bir tür olarak peroksinitrit ($ONOO^-$) gibi reaktif nitrojen türlerinin fizyolojik fonksiyonları üzerine yoğunlaşılmıştır (Nagano 2009). Reaktif nitrojen türlerine üç tane oksit NO (nitrojen monoksit, nitrik oksit), N_2O_3 (dinitrojen trioksit) ve NO_2 (nitrojen dioksit), üç anyon NO^- (oksidonitrat, nitroksil anyon), $ONOO^-$ (oksidoperoksidonitrat, peroksinitrit, peroksonitrit), $ONOOCO_2^-$ (1-karboksilato 2-nitrozodioksidan, nitrosoperoksi karbonat) dahildir (Olmos ve ark 2007).

Furchgott ve Zawadski 1980 yılında asetilkolinin neden olduğu damar gevşemesinin endotelden kaynaklanan gevşetici bir faktör "endothelium-derived relaxing factor" (EDRF) aracılığıyla gerçekleştiğini rapor ettiler. Dr. Furchgott 1986 yılında EDRF ve NO'nun farmakolojik davranışlarındaki benzerliklerinden dolayı EDRF'nin NO olabileceğini bildirdi. Endotelden kaynaklanan gevşetici faktör 1987 yılında NO molekülü olarak tanımlandı, 1988'de de damar endotel hücrelerinin L arginin aminoasidini NO sentezinde kullandığı gösterildi (Moncada ve ark 1988, Nagano 2009). Birçok araştırma NO'nun güçlü anti-enflamatuvar özelliklere sahip olduğunu gösterirken (Abramson ve ark 2001, Cabrera ve ark 2004, Clancy ve ark 1998), diğer çalışmalarda da NO'nun enflamasyonu arttırarak hücre ve doku disfonksiyonunu tetiklediği ileri sürülmüştür (Chan ve ark 1995, Daghigh ve ark 2002, Yoon ve ark 2000).

Memeli hücrelerinden sentezlenen bu iki atomlu "diatomic" serbest radikal, kardiyovasküler, nöronal ve immün sistemlerin hemostatik düzenlenmesinde önemli rol oynar. Bu önemli fizyolojik fonksiyonlarına rağmen, nitrojenin bu oksidize metaboliti, hava kirliliği ve sigara dumanının içinde bulunan iyi bilinen toksik bir ajandır. Çevresel bir toksin olmasına ek olarak, endojen olarak oluşan NO'nun artirit, hepatit, enflamatuvar bağırsak hastalığı, septik ve hemorajik şok ve bazı otoimmün hastalıklar gibi kronik enflamatuvar hastalıkları tetiklediği düşünülmektedir. Nitrik oksit, lipid peroksidasyonunu başlatan, çeşitli enzimleri baskılayan ve DNA hasarı yapan nitrojen oksid türlerini üretebilir (Grisham ve ark 1999). Ayrıca, kan basıncının düzenlenmesi, nörotransmisyon, savunma mekanizmaları, düz kas relaksasyonu ve bağışıklık sisteminin düzenlenmesi gibi birçok fizyolojik olayda yer alır (Valko ve ark 2007). Nitrik oksit hem apoptozisin başlamasında hemde

baskılanmasında etkili olabilir. Hücresel "turnover"ı durdurucu etkisinin yanında kollajenin yeniden organize olmasına da izin verir (Väisänen-Tommiska 2008).

1.3.2. Nitrik Oksitin Fizyolojik Kimyası ve Enflamasyondaki Rolü

Nitrik oksitin doğrudan ve dolaylı olarak etkileri vardır. Doğrudan etkiler NO'nun düşük konsantrasyonlarında ya da akışında oluşurken, dolaylı etkiler yüksek NO akışlarında oluşur. Nitrik oksitin doğrudan etkileri, metal içerikli proteinler veya organik serbest radikallerle etkileşimi olmak üzere iki şekilde gerçekleşir (Grisham ve ark 1999).

Metal nitrosil kompleksleri: Nitrik oksit ile guanilat siklazın reaksiyon girmesi, guanozintrifosfat'tan siklik guanozinmonofosfat oluşumunu stimüle eder. Bu siklik guanozinmonofosfat sentezinin, lökosit-endotelyal hücre etkileşimlerinin, platelet agregasyonunun baskılanması ve vasküler tonus ayarlanması gibi düzenleyici "regülatör" ve anti-enflamatuvar etkileri mevcuttur. Bu tip kimyasallar aynı zamanda sitokrom-p-450, NOS, sitokrom oksidaz ve katalaz gibi diğer metalloproteinleri baskılayabilmektedir (Grisham ve ark 1999).

Ayrıca, küçük miktarlardaki NO'nun prostoglandin üretimini arttırdığı gösterilmiştir. Süperoksit'in siklooksijenaz ve prostoglandin sentezinde görev alan diğer enzimleri baskıladığı düşünülmektedir. Küçük miktarlardaki NO demirinin "heme iron" azalmasını engeller. Bu durum siklooksijenaz ilişkili "heme iron"nu ferrik formda tutar. Bu durum koruyucu anti-enflamatuvar prostoglandinlerin oluşumu ile sonuçlanır. iNOS kaynaklı NO'in aşırı üretimi siklooksijenaz aktivitesini baskılayarak enflamasyonu baskılamaktan çok tetikleyebilir (Grisham ve ark 1999).

NO, metal kompleksleri ve oksidatif stres: Demir veya hemoprotein katalizli oksidatif reaksiyonlar, akut ve kronik enflamasyonla ilişkili patofizyolojiye aracılık eder. Bu oksidatif stres, endotelyal hücre ve lökosit adezyon molekülü ekspresyonunu artırabilir, hücre hasarına neden olabilir, apoptozisi arttırabilir, DNA hasarına neden olabilir, enflamatuvar belirteç sentezini tetikleyebilir ve gen ekspresyonunu düzenleyebilir (Grisham ve ark 1999).

Nitrik oksit enflamasyonda rol alan, vasküler hücreler üzerinde uyarıcı etkileri olan biyoaktif bir moleküldür. Arjininin terminal guanidino nitrogen

atomundan oluşan kısa yaşam süreli (<15 saniye), gaz yapıda bir serbest radikaldir. Oksijen varlığında hızla nitrit ve nitrata metabolize olur (Isenberg ve ark 2005, Clancy ve ark 1998). Düşük oksijen konsantrasyonlarında daha stabildir. Hem sulu hem de lipid ortamda çözünebildiği için stoplazma ve plazma membranlarından kolayca diffüze olur. Enflamasyon sırasındaki oksidatif patlamada süperoksit anyonu ve NO immün sistem hücrelerinde üretilir. $ONOO^-$ ve ONOOH karbonhidratları, sülfidrilleri, lipidleri ve DNA bazlarını direkt okside edebilme özelliğine sahiptirler. İlaveten endotel hücreleri için toksik ve bakterisidaldir. ONOOH stabil değildir ve hızla ·nitrojen dioksit (NO_2) sonrasında da nitrat'a (NO^-_3) dönüşür (Chapple ve Matthews 2007).

$$NO^{\bullet} + O_2^{\bullet -} \rightarrow ONOO^-$$

$$ONOO^- + H^+ \leftrightarrow ONOOH \rightarrow [\text{''}OH\cdot + NO_2\cdot \text{''}] \rightarrow NO^-_3 + H^+$$

Peroksinitrit anyonu ($ONOO^-$) ve peroksinitröz asit (ONOOH)'in toksisitesi oksijen radikali veya NO'in tek başına oluşturabileceğinden çok daha fazladır. Bu yüzden NO toksisitesi temel olarak süperoksit anyonu ile birlikte bulunmasına bağlıdır (Conner ve ark 1996, Valko ve ark 2007). Süperoksit, pro-enflamatuvar sitokinlerin NFκB transkripsiyonunu tetiklemek gibi çeşitli yollarda pro-enflamatuvar bir etki oluşturur. Diğer etkiler; 1) endotelyal hücre hasarı, 2) vasküler permeabilite artışı, 3) lökotrien B4 formasyonu yolu ile nötrofil kemotaksisi, 4)l ipid peroksidasyonu ve 5) DNA sarmalı kırılması (Chapple ve Matthews 2007).

Nitrik oksit sentezleyen nitrik oksit sentaz enzimi (NOS) tetrahidrobiopterin yokluğu gibi bazı durumlarda NO^- sentezleyebilir. Nitroksil anyonu tioller, aminler gibi farklı molekülleri okside eder, metalerin indirgenme nitrosilasyonuna katılır ve diğer oksijen bağımlı reaksiyonlar vasıtasıyla bazı sitotoksik etkilerden sorumlu olduğu görülmektedir (Olmos ve ark 2007). Nitrik oksit ve serbest radikaller metal nitrosil oluşumuna ek olarak, NO karbon, oksijen, nitrojen merkezli radikaller gibi yüksek enerjili serbest radikaller ile direkt reaksiyona girebilir. Bu tip reaksiyonlar metal veya enzim katalizli lipid peroksidasyonunun düzenlenmesinde önemli olabilir. Çoklu doymamış "unsatüre" lipidlerin peroksidasyonu, birçok farklı enflamatuvar durumdaki disfonksiyon ve doku hasarının gelişmesinde önemli bir patofizyolojik olay olarak düşünülmektedir. Son zamanlardaki çalışmalar, NO'in lipid

peroksidasyonunu baskıladığı ve böylece pro-enflamatuvar lipid oluşumunu azaltarak enflamatuvar cevabın düzenlenmesinde önemli olabileceğini göstermiştir (Grisham ve ark 1999).

Nitrik Oksitin pro-enflamatuvar özellikleri

1) Vazodilatasyonu ve damarsal sızdırganlığı uyarır. 2) Oksijen ile reksiyona girer ve toksik peroksinitrit oluşturur. 3) NFκB ve JNK aktivasyonunu sağlar. 4) Siklo-oksijenazı aktive eder. 5) Sitotoksik; apoptozisi uyarır. 6) TNF-α üretimini uyarır. 7) Doğal öldürücü hücre "natural killer" (NK) hücre aktivasyonunu arttırır. 8) NO sentezi, deneysel artrit, murine lupus, carrageenin'le uyarılan enflamasyon, immün kompleks akciğer hasarını baskılayabilir (Abramson ve ark 2001).

Nitrik Oksitin anti-enflamatuvar özellikleri

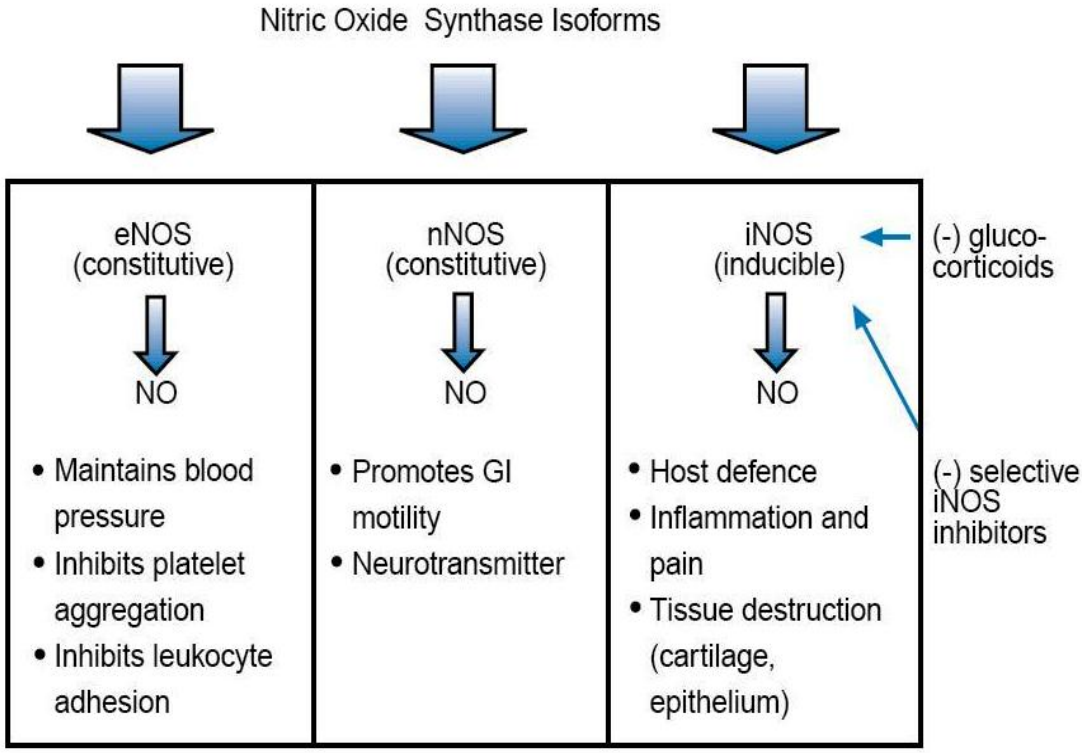
1) Mast hücresi degranülasyonunu, 2) Trombosit ve nötrofillerden p-selektin ekspresyonunu, 3) Aktin stres liflerinin merkez adhezyon alanlarına toplanmasını, 4) Trombosit ve nötrofillerin endotel adezyonunu. 5) Lökosit süperoksit anyon üretimini. 6) T hücresi proliferasyonunu ve antijene bağlı hücre aktivitesini ve 7) Siklooksijenaz'ı baskılar (Abramson ve ark 2001).

Ortamdaki sitokin dengesi iNOS üretimini düzenler örneğin; TGF-β, IL-4 ve IL-10 makrofajlardan iNOS ekspresyonunu baskılar (Abramson ve ark 2001). Diğer taraftan IL-1β, interferon γ gibi sitokinler vasıtasıyla çeşitli dokularda iNOS ve bununla birlikte NO üretiminin uyarılabileceği rapor edilmiştir (Stuehr ve ark 1991, Hibbs ve ark 1992, Balligand ve ark 1994, Rosenkranz-Weiss ve ark 1994, Tatsumi ve ark 2000). Ayrıca insan ada langerhans hücrelerindeki insülin üretiminin sitokinler tarafından baskılanmasında NO'nun etkili olduğu rapor edilmiştir (Corbett ve ark 1993). Bununla birlikte NO'ya bağımlı mekanizma ile sitokinlerin organizmaki DNA üzerinde yıkıcı ve yapıcı etkilerinin olabileceği belirtilmiştir (Jaiswal ve ark 2000).

Nitrik oksit, nitrik oksit sentazlar adı verilen enzim ailesinin bir üyesi olan L-arjininden sentezlenir ve üç formu mevcuttur (Resim 1.2):

- tip 1 nitrik oksit sentaz–nöronal, beyin enzimi (nNOS),

- tip 2 nitrik oksit sentaz–indüklenebilir enzim (iNOS), makrofajlarda bulunur,
- tip 3 nitrik oksit sentaz–endotelyal hücre enzimi (eNOS) (Chapple ve Matthews 2007).



Resim 1.2. Nitrik oksit izoformları (Abramson ve ark 2001).

Endotelyal nitrik oksit sentaz, kan damarlarındaki düz kas gevşemesine "vazodilatasyon" neden olur. Çünkü nitrik oksit, hücrelere kolayca giren ve hemoglobinde oksijen bağlayan "heme-bound iron" komponentine bağlanan küçük lipofilik bir moleküldür. Bu ve sonraki sitosolik etkileşimler hücresel kalsiyumun ayrılmasına bu da hücre içi kalsiyum düzeylerini azaltarak düz kas gevşemesine neden olur. Bununla birlikte makrofaj kaynaklı iNOS, süperoksit ile aynı anda salındığında reaktif nitrojen türleri peroksinitrit anyonu oluştururlar. Peroksinitrit gerçek bir radikal olmadığı halde, daha önceden nitrik oksit ve süperoksidin yaptığı bilinen pek çok sitotoksik etkilerden sorumlu olduğuna inanılmaktadır (Chapple ve Matthews 2007). Bu etkiler;

- Lipid peroksidasyonu,
- Oksidasyonla glutatyon azalması,
- Superoksit dismutaz aktivitesini baskılayabilen nitrotirosin formasyonu,
- Nitrosilasyon, deaminasyon ve oksidasyon ile DNA hasarı,

- Yüksek konsantrasyonları hızlı hücresel nekroza,
- Düşük konsantrasyonları apoptozise neden olur (Chapple ve Matthews 2007).

Endotelyal nitrik oksit sentaz ve nNOS kalsiyum/kalmodulin bağımlı salgılanırken, iNOS salınımı bakteriyel lipopolisakkaritler ve sitokinlerin uyarmasıyla kalsiyumdan bağımsız olarak gerçekleştirilir (Väisänen-Tommiska 2008). İndüklenebilir nitrik oksit sentaz aktivitesi sitokinler tarafından kontrol edilir. İnterlökin-4, IL-10 ve TGF-β iNOS aktivitesini baskılarken, buna zıt olarak gama interferon, IL-1 ve lipopolisakkarit iNOS üretimini uyarıcı bir etki gösterir (Abramson ve ark 2001, Isenberg ve ark 2005). Aşırı sitokin üretimine cevap olarak iNOS sentezi birçok hücrede olabilecek özelliği olmayan "nonspesifik" bir olaydır. Artmış iNOS ve/veya NO üretimi sepsis, ülseratif kolit, sedef, artrit, multiple skleroz, tip 1 diyabet, sistemik lupus eritematozus, sjögren sendromu gibi durumlarda yara iyileşmesi, yanık, endotoksine maruz kalma, iskemi/perfüzyon yaralanmaları ve enflamatuvar bağırsak hastalıklarında gözlenir (Clancy ve ark 1998). Nitrik oksit yüksek konsantrasyonlarda makrofajlarda, kondrositlerde, CD4+/CD8+ timositler gibi hücrelerde apoptozisi arttırırken düşük konsantrasyonlarda hepatositlerde, B lenfositlerde ve eazinofillerde kaspaz-3 benzeri aktiviteyi baskılayarak apoptozise engel olur (Clancy ve ark 1998, Clemens 1999).

Nitrik oksit formasyonu bakteri, parazit ve virüslere karşı ilk savunma hattı olarak rol oynayabilir. Nikrik oksidin sitotoksik etkileri sadece yayılım "invazyon" yapan mikroorganizmalar için değil bu hücrelerin öldürülmesinde de "nonspesifik immünite"yi sağlar (Clancy ve ark 1998). Serbest radikal türleri; oksijen veya nitrojen kaynaklı, fiziksel olarak stabil olmayan bir çok patolojik olaya neden olan oldukça reaktif moleküllerdir. Birçok önemli serbest radikal arasında süperoksit anyon radikali (O_2^-) ve NO mikrobiyal enfeksiyonlar sırasında birçok biyolojik olayla ilgili konak kaynaklı radikallerdir. Enflame dokularda beraberindeki oksijen radikallerinden ve özellikle de süperoksit anyon radikali'den etkilenerek NO, peroksinitrit gibi reaktif nitrojen oksitlere dönüşür. Bu ara ürünler çeşitli hastalıkların patogenezinde NO veya süperoksit anyon radikali'den daha fazla görülürler (Akaike 2001, Clemens 1999).

Nitrik oksit'in vasküler tonusun düzenlenmesinde, nörotransmisyon ve konak savunma mekanizmalarında kritik bir role sahip olduğu ispatlanmıştır. Yine de

NO'in enflamasyondaki rolü oldukça komplekstir. Nitrik oksit enflamasyonda yüksek düzeylerde sentezlendiği için pro-enflamatuvar bir ajan olarak rol oynayabilir. Diğer taraftan hücreler üzerindeki baskılayıcı etkileri nedeniyle anti-enflamatuvar olarak rol oynayabilir. Farklı etkileri NO'in konsantrasyonlarına ve antioksidan/anti-enflamatuvar sistemlerin varlığına bağlı olabilir. eNOS ve nNOS kaynaklı düşük miktarlardaki NO'nun faydalı olduğuna inanılmakla birlikte, iNOS tarafından yüksek miktarda üretilen NO'nun farklı deneysel enflamasyon modellerinde yaralanmaya katkıda bulunabileceği gösterilmiştir. Yine de iNOS'un baskılanmasının bazı şartlarda enflamatuvar cevabı arttırabileceği, iNOS kaynaklı NO'nun hücrekoruyucu/anti-enflamatuvar enzimleri veya molekülleri uyarabileceği bildirilmektedir (Pae ve ark 2009).

Nitrik oksit moleküler hücresel ve fizyolojik olayları etkileyen kısa ömürlü bir serbest radikaldir. Nitrik oksitin yara iyileşmesinde oldukça önemli bir element olduğu kanıtlanmıştır (Rizk ve ark 2004). Nitik oksit yara oluşumu sonrası enflamasyonu başlatan kemoatraktan sitokinlerle, monosit, nötrofil gibi hücrelerin aktivitelerini düzenler (Luo ve Chen 2005).

Nitrik oksit düzeyleri enzimler tarafından düzenlenir. Yara iyileşmesinin erken fazlarında iNOS üretimi yüksektir ve artmış NO üretiminden sorumlu tutulmaktadır. Sıçan yara modellerinde yaralanmadan sonraki ilk beş günde iNOS üretimi artmıştır. Tamirin erken enflamatuvar fazında temel iNOS kaynağı makrofajlardır ancak lokalize makrofajlar, fibroblastlar ve keratinositler tarafından da üretilmektedir (Isenberg ve ark 2005). Bir yara iyileşmesi modelinde aşil tendonu NO ve flurbiprofen ile tedavi edilmiştir. Tendon örneklerinde NO ile tedavi edilen grup taşıyıcı ile tedavi edilen gruba göre daha iyi ekstraselüler kollajen matriks organizasyonu göstermiştir. Hem flurbiprofen hem de NO-flurbiprofen tendon iyileşmesi esnasında kollajenin daha iyi organize olmasını tetiklemişlerdir (Yuan ve ark 2003).

Eksizyonel yaralarda, iyileşme iNOS baskılanması ile gecikir. Kollajen üretiminden ve yara bölgesinde depozisyondan sorumlu yara fibroblastları, implante edilmiş polyvinil alkol süngerlerden izole edildiğinde artmış NO üretimi göstermişlerdir. Bu durum NO ve kollajen üretiminin ilişkili olduğunu göstermiştir.

Nitrik oksit sentazın baskılanmasıyla bu hücrelerde kollajen üretiminin azaldığı rapor edilmiştir (Isenberg ve ark 2005).

Malnutrisyon, diyabet gibi patolojik durumlarda oluşan NO eksikliğinde, yara iyileşmesinde gecikme ve hücreler arası matriks yığılımında bozulma olduğu rapor edilmiştir (Isenberg ve ark 2005). Nitrik oksitin yara iyileşmesi üzerine olumlu etkileri olduğu ve birçok fizyolojik olayda önemli bir mesaj iletici olarak görev yapan bir molekül olduğu bilinmektedir (Murrell ve ark 2008).

1.3.3. Nitrik Oksit ve Periodontal Hastalık

Periodontal hastalık varlığında iNOS düzeylerinin sağlıklı bireylere göre daha fazla olduğu rapor edilmiştir (Hirose ve ark 2001, Batista ve ark 2002, Di Paola ve ark 2006, Muià ve ark 2006, Pan ve ark 2010). Lokalize agresif periodontitis teşhisi konulmuş bireylerden elde edilen nötrofillerde sağlıklı bireylerden elde edilene göre NOS aktivitesinin daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Shibata ve ark 2001). Bununla birlikte kronik periodontitisli bireylerin dişeti dokusundaki iNOS salgılanmasın sağlıklı kontrollerden daha fazla olduğu rapor edilmiştir (Pan ve ark 2010). İnsanlardan elde edilen dişeti fibroblastlarının TNF-α, IL-1β gibi pro-enflamatuvar sitokinlerin varlığında NO ve iNOS sentezlediği gösterilmiştir (Daghigh ve ark 2002). Periodontal dokularda enflamasyonun yoğun olduğu bölgelerde iNOS salgılanmasının daha yüksek düzeyde olduğu rapor edilmiştir (Güllü ve ark 2005). Periodontopatojenlerin lipopolisakkaritiyle uyarılan makrofajların bulunduğu ortama eklenen üzüm çekirdeği özütünün, makrofajlardan daha az NO, iNOS ve serbest radikal üretilmesini sağladığı saptanmıştır (Houde ve ark 2006). Deneysel periodontitis oluşturulan sıçanların dişeti dokularında iNOS ve TNF-α düzeylerinin arttığı belirtilmiştir (Muià ve ark 2006). Ayrıca periodontitisin şiddetinin artışıyla birlikte tükrükteki NO miktarının yükseldiği rapor edilmiştir ve tükrükteki NO düzeyinin periodontal hastalığın seviyesinin tespitinde kullanılabileceği belirtilmiştir (Reher ve ark 2007). Diğer taraftan periodontitisli bireylerin tükrüklerindeki nitrik oksit düzeyinin sağlıklı kontrollerden daha düşük olduğu rapor edilmiştir (Aurer ve ark 2001). Nitrik oksitin kemik metabolizmasındaki rolü iki yönlüdür. Alveolar kemik yapımını veya yıkımını uyarabilir. Deneysel periodontitis oluşturulan sıçanlara NO donörü olan "isosorbid" uygulamasıyla AKK'nin azaldığı saptanmıştır (Leitão ve ark 2004). Diğer taraftan deneysel periodontitis oluşturulmuş sıçanlara

iNOS üretimini baskılayan maddelerin (L-arjinin metil ester, rosiglitazon, aminoguanidin) uygulanmasıyla birlikte deneysel periodontitiste artan iNOS düzeyinin baskılandığı bununla birlikte tüm enflamatuvar belirteçlerin azaldığı ve deneysel periodontitise bağlı oluşan AKK'nin engellendiği rapor edilmiştir (Leitão ve ark 2005, Di Paola ve ark 2006).

1.4. Apoptozis

Apoptozis terimi eski Yunanca'da ayrı "apo" ve düşen "ptosiz" kelimelerinin birleşmesinden oluşur: "Çiçekten düşen yapraklar" ya da "sonbaharda bir ağaçtan kalanlar" anlamına gelmektedir. İlk kez 1972 yılında tanımlanmış olan apoptozis programlı hücre ölümüne eşdeğer olarak kabul edilmektedir (Kerr ve ark 1972). Apoptozis, çok hücreli organizmaların genetik şifrelerinde bulunan "hücre intiharı" programlarının gelişimsel ve/veya çevresel uyaranlarla etkinleşmesi sonucu ortaya çıkan, gelişim ve farklılaşma sırasında organ yapısı ve işlevlerinin aktif değişimini sağlayan fizyolojik hücre ölümü olarak tanımlanmaktadır (Hockenbery 1995, Loro ve ark 2005). Bütün hücreler önceden belirlenen bir yaşam süresine sahiptir ve belirli bir zamanın sonunda ölmeye programlanırlar. Yeni hücrelerin çoğalması ve yaşlı hücrelerin ölümü arasındaki denge ile vücudumuzdaki fonksiyonel hücre sayısı belirlenir (Kerr ve ark 1994, Loro ve ark 2005). Yaşlı hücreler önceden belirlenen yaşam süreleri dolduğunda faaliyetleri durdurulmak üzere programlanmış olduklarından ölürler. Apoptozis hücrelerin fizyolojik olarak uzaklaştırılmasında temel mekanizmadır ve embriyogenezis ve normal homeostasis esnasında önemli rol oynar (Osawa ve ark 2003, Loro ve ark 2005, Henson ve ark 2006). Bir başka deyişle hücre popülasyonun geri kalanının iyiliği gerektiğinde, kendilerinde var olan intihar programını devreye sokarak programlı bir şekilde, çevreye hiç zarar vermeden yaşamlarını yitirirler (Allen ve ark 1997, Afford ve Randhawa 2000, Franz ve ark 2006).

Yaşamakta olan hücreler iki farklı mekanizma ile ölürler: Bu mekanizmalar "nekroz" ve "apoptozis"tir (Aigner 2002). Nekroz, hipoksi, ağır yaralanma, enfeksiyon, aşırı ısı değişiklikleri, toksinler gibi hücre dışından gelen çeşitli fiziksel ve kimyasal etkenler sonucunda gelişen travmatik hücre ölümüdür. Apopitozis ise yaşlanmış, fonksiyonunu yitirmiş, fazla üretilmiş, düzensiz gelişmiş veya genetik olarak hasarlı hücrelerin, organizma için güvenli bir şekilde yok edilmelerini

sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür (Loro ve ark 2005). Apoptozis, nekroz veya kazaya bağlı ölümler gibi pasif bir sistem değil, programlanmış birçok genin katıldığı aktif bir sistemdir (Häcker 2000).

Hücre tarafından apoptozis kararı verildikten sonra, tanınma için kendine özgü bir morfoloji gösteren apoptotik hücre fagosit tarafından belirlenir ve etrafında herhangi bir doku hasarı bırakmadan, enflamatuvar mekanizmalara yol açmadan ortadan kaldırılır (Häcker 2000, Aigner 2002). Nekroz patolojik bir olayken, apopitoz ise fizyolojik veya patolojik uyaranlarla oluşabilir. Nekroz ve apoptozisin başlıca farklılıkları aşağıdaki gibidir: 1) Nekrozda enerji gereksinimi yoktur, apoptozis ise ATP'ye bağlı olarak gelişir ve yeterli ATP yoksa apoptozis gerçekleştirilemez. 2) Nekrozun histolojisinde, hücresel şişmeyle birlikte organel bozukluğu ve doku parçalarının ölümü söz konusudur. Apoptozisin histolojisinde ise kromatin kondensasyonu, apoptotik cisimcikler, izole tek hücrenin ölümü vardır. 3) Nekrozda DNA kırık modeli düzensiz gelişigüzel kırıklar şeklinde gerçekleşirken, apopitozisde ise 185 baz çiftli kırıklar şeklinde "ip merdiven" görüntüsünde gerçekleşir. 4) Nekrozda, plazma zarı parçalanmış haldedir. Apoptoziste ise plazma zarı moleküler değişiklikler olmasına rağmen parçalanmamış halde bulunur. 5) Hücrelerin fagositozu nekrozda fagositlerin göçüyle gerçekleştirilirken, apoptoziste fagositoz ilgili bölgeye komşu hücrelerle gerçekleşir. 6) Nekrozda doku reaksiyonu enflamasyon iken apoptozda enflamasyon görülmez (Hetts 1998).

Apoptozisin düzgün olarak işlemesi organizmanın hayatını uygun şekilde devam ettirebilmesi için oldukça önemlidir. Apoptozis, özellikle embriyonal ve fötal gelişimde, hormon azalmasına bağlı dokuların normal boyutuna dönmesi "involusyon"larda, dokulardaki hücre homeostazının sağlanmasında, immun reaksiyonlarda, savunma amaçlı hücrelerin herhangi bir nedenle hasarlanmaları gibi durumlarda ve yaşlılıkta görülür, hücreler sürekli değiştirilir ve yerine yenisi konur (Geske ve Gerschenson 2001). Her gün yaklaşık $1x10^{11}$ hücrenin öldüğü tahmin edilmektedir, ayrıca yetişkin bir insanın her 18-24 ayda vücut ağırlığına eşdeğer hücresi yenilenir (Israels ve Israels 1999, Loro ve ark 2005). Apoptozis mitozdan 20 kat daha hızlıdır. Apoptotik hücreler herhangi bir işaret olmaksızın komşu hücreler tarafından yutulur ve parçalanır. Hücrenin dış uyaranlara karşı kendini koruyabilmesi "homeostaz"ın sağlanabilmesi için hücre sayısındaki artış ve hücre ölümdeki azalma

arasında bir denge olmalıdır. Eğer hücre ölümü olmaksızın sadece mitoz olsaydı 80 yaşındaki bir kişi iki tonluk kemik iliği ve lenf noduna ve 16 km'lik sindirim sistemine sahip olurdu (Lawen 2003).

Hücrelerin apoptototik sistemindeki bozukluklar hücrelerin yaşam sürelerinin uzamasına neden olabileceği gibi hücrelerin hızlı ve aşırı bir şekilde kaybına ve çeşitli hastalıkların oluşmasına da sebep olabilir (Soini ve ark 1998, Geske ve Gerschenson 2001, Almasan ve Ashkenazi 2003, Katano ve ark 2004, Andersen ve ark 2008, Munoz ve ark 2008). Apoptozis mekanizmasında olabilecek bir bozukluk, apoptozise uğraması gereken değişik morfolojiye sahip hücrenin yaşamasına fırsat verir ve bu süreçte işleyen olaylar tümör gibi patolojik durumların gelişmesinde önemli bir rol oynayabilir (Wyllie 1993, Parton 2001). Apoptozis programının daha iyi anlaşılması, özellikle kanser hastalarının tedavisine yönelik çalışmalarda yeni ve güçlü umutlar vermeye adaydır (Bold ve ark 1997). Bu noktada apoptozis, aynı zamanda gen tedavisinin önemli amaçlarından biridir. Konuyla ilgili birçok gen tespit edilmiş ve bu genlerle *in vitro, in vivo* ve faz çalışmaları yapılmaktadır. Bu alanda üzerinde çalışılan genlerin bazıları apoptozisi arttıran (proto-onkogenler) p53, MYC, Bax, Bcl-XS ve apoptozisi azaltan (tümör suppressor genler) Bcl-xl, Bcl-2, Mcl1'dir (Miyashita ve Reed 1995, Cao ve ark 2001, Geske ve Gerschenson 2001, Mohiuddin ve ark 2001, Smythe ve ark 2002, Yoshida ve ark 2006).

Apoptozisin artmasıyla ilgili hastalıklar: 1) Nörodejenaratif bozukluklar: Alzheimer hastalığı, amiyotrofik lateral skleroz, "Creutzfeld-Jakob" hastalığı, "Huntington" hastalığı, parkinson hastalığı, retinitis pigmentosa, spinal muskular atrofi. 2) Hematolojik bozukluklar: Aplastik anemi, "Fanconi" anemisi, "Hodgkin" hastalığı, myelodisplastik sendromlar, polycythemia vera. 3) Otoimmün bozukluklar: Fulminant hepatit, graft-versus-host hastalığı, "Hashimoto" tiroiditis, insüline bağlı diyabet, multipli skleroz, romatoid artrit, skleroderma "Sjögren" sendromu. 4) İskemik yaralanma: İskemi ve reperfüzyon, böbrek enfarktüsü, miyokardial enfarktüs, felç. 5) Toksinlere bağlı hastalıklar: Alkole bağlı hepatit, pulmonar fibrozis, sepsis. 6) Bakteriyal ve viral enfeksiyonlar: Kazanılmış immün yetmezlik sendromu "acquired immunodeficiency syndrome" (AIDS), Ebola virüsü, *Chlamydia trachomatis, Helicobacter pylori, Neisseria meningitis, Salmonella typhimurium,*

Shigella flexneri. 7)Diğerleri: Tümör karşı-atağı (“immun privilege”), travmatik spinal kord yaralanması (Fadeel ve ark 1999, Zhang ve Xu 2002).

Apoptozisin azalmasıyla ilgili hastalıklar: 1) Kanser: Blastom, karsinom, lösemi, lenfoma malign gliom, sarkom, seminom 2) Premalign hastalıklar: “Ataxia telangiectasia”, paroksimal nokturnal hemoglobinüri, myelodisplastik sendromlar, “xeroderma pigmentosum”. 3) Otoimmün bozukluklar: Otoimmün lemfoproliferatif sendrom (tip I ve II), sistemik lupus erythematosus. 4) Ateroskleroz. 5) Metabolik bozukluklar: “Niemann-Pick” hastalığı, osteoporozis, “Wilson” hastalığı. 6) Viral enfeksiyonlar: Adenovirus, “Baculovirus”, “Epstein-Barr” virus, “Herpes” virus, “Pox” virus (Fadeel ve ark 1999, Katano ve ark 2004).

Prematür ve fizyolojik yaşlanmada apoptoz: Down sendromu, Erken yaşlanma “Progeria” ve “Xeroderma pigmentosum” (Fadeel ve ark 1999, Geske ve Gerschenson 2001, Almasan ve Ashkenazi 2003, Katano ve ark 2004, Andersen ve ark 2008, Munoz ve ark 2008).

Apoptozise müdahale edilerek geliştirilen tedavi örnekleri vardır: Aspirin, sikloksijenaz-2 inhibitörleri, non-steroidal anti-enflamatuvar ilaçların “kolorektal adenoma” ve kansere karşı koruyucu olduğu kanıtlanmıştır. Bu etki sikloksijenaz-2 enziminin baskılanması doğrultusunda apoptozisin arttırılması ile ilişkili olabilir (Renehan ve ark 2001).

Antikanser ilaçları, radyoterapi, sitotoksik ilaçlar ve radyoterapi normal hücrelerde ve tümörlerde apoptozisi arttırır. Bu tedavilerden p53’e bağımlı ve bağımsız mekanizmalar tanımlanmıştır. Bcl-2 genetik üzerine etkili olan “antisense” tedavi ile ilgili ilk klinik çalışmalarda non-Hodgkin's lenfoma gibi bazı hastalıkların olumlu sonuç verdiğini göstermiştir. Rekombinant tümör nekroz faktör-ilişkili apoptozis-uyarıcı ligand “Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand” tedavisinde, akciğer, göğüs, kolon ve böbrek kanserlerinin tümör nekroz faktör-ilişkili apoptozis-uyarıcı ligand’a karşı duyarlı olduğu ve apoptozisi uyardığı preklinik çalışmalarla kanıtlanmış ve desteklenmiştir. “Kaspaz inhibitörleri”nin travmatik beyin yaralanması, “amiyotrofik lateral skleroz” ve parkinson hastalığında pozitif preklinik hayvan modelleri gösterilmiştir. Antioksidan tedavisinde ise “pyrrolidinedithiocarbamate” ve bir E vitamini analoğu olan “6-hidroksi-2,5,7,8

tetramethylachromancarboxylic acid" kullanıldığında bir primidin analoğu olan "floroaçil"in artışıyla kolorektal kanser hücrelerinde apoptozisi arttırdığı saptanmıştır. İnterlökin-1 reseptör antagonistlerinin sıçan modellerinde iskemik beyin hasarında azalmasına yardımcı olduğu rapor edilmiştir (Renehan ve ark 2001).

Hücre ölümünün düzenlenmesinde mitokondri önemli bir rol oynar (Esposti 2004, Gogvadze ve Orrenius 2006). Bcl-2 protein ailesinin anti-apoptotik üyeleri, mitokondri membranının dış kısmında yer alır ve hücre yaşamını devam ettirmeye yönelik çalışırlar. Bad ve Bax gibi Bcl-2 ve Bcl-xl ile ya da mitokondri membranı ile doğrudan "direkt" ilişki kurarak mitokondri üzerinden etkilerini gösterirler (Smaili ve ark 2000, Cao ve ark 2001, Orrenius 2004, Takahashi ve ark 2004). Mitokondri apoptozisin gerçekleşmesini sitokrom-c salınımıyla sağlar ve prokaspaz-9 ile birlikte apoptotik proteaz aktive edici faktör -1 ve ATP bir kompleks oluşturur. Bu kompleks kaspaz-9'un aktivasyonunu sağlar (Gross ve ark 1999, Smaili ve ark 2000).

Apoptoziste yanıt olarak yeralan protein ailesi olan Bcl-2 proteinlerinin bir kısmı "anti-apoptotik", diğerleri de "pro-apoptotik"tir (Sainz ve ark 2003). Hücrelerin apoptotik uyarana duyarlılığı pro- ve anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin arasındaki dengeye bağlıdır. Hücrede pro-apoptotik proteinler fazla olduğunda hücre apoptozise daha duyarlı olurken, anti-apoptotik proteinlerin fazlalığında ise hücreler uyarana daha az tepki gösterir (Huppertz ve ark 1999, Sainz ve ark 2003).

Apoptozisin genetik olarak düzenlenmesi, p53 ile başlayan ve kaspazlara kadar devam eden bir süreçtir. Bir tümör baskılayıcı gen olarak çalışan p53 mutasyona uğradığı ya da bulunmadığı zaman hücre yaşamı uzar. Genotoksik olaylarla oluşan hücre hasarı, bir transkripsiyon düzenleyici geni olan p53'ü aktive eder. Bir protein ürünü olan p53, DNA'ya doğrudan bağlanarak hasarı tanıdıktan sonra, ya tamir için gerekli zamanı kazanır ya da hasar fazlaysa apoptozise yönlendirir. Ayrıca, p53'ün Bax/Bax, Bax/Bcl-2, Bcl-2/Bcl-2 gruplarının oranlarını düzenlediği düşünülmektedir (Schwartz ve ark 1990, Huppertz ve ark 1999, Israels ve Israels 1999). Apoptozisin düzenlenmesinde Bcl-2/Bax gen ailesinin önemi üzerinde durulmuştur. Bu gen ailesinin 20 üyesi tanımlanmıştır; bunlardan bazıları apoptozis baskılayan "anti-apoptotik" özellikteki Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Boo, Mcl-1 genleri, diğerleri ise apoptozisi artıran "pro-apoptotik" genler olarak tanımlanır. "Pro-apoptotik" genler: Bax ve Bh3 olmak üzere iki alt aileye sahiptir. Bcl-2/Bax

gen ailesinin ürünleri, mitokondiri ve çekirdek zarlarının yanı sıra endoplazmik retikulum zarının üzerinde de yer alırlar ve kompleks oluşturarak çalışırlar. Örneğin; Bcl-2'nin Bax ile olan etkileşiminde Bcl-2'nin oranının daha yüksek olması hücrenin yaşamını sürdürmesini sağlarken, Bax'ın daha fazla olması durumunda hücre ölüme gitmektedir (Kaneda ve ark 1999, Israels ve Israels 1999, Pongrakhananon ve ark 2010). Beslenme yetersizliği, hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerinin aktivasyonu, kimyasallar, iyonize radyasyon ve direkt fiziksel yaralanma gibi fizyolojik ve patolojik uyaranlar apoptozisi arttırabilir. Bu uyaranlar farklı yollarla apoptozisi başlatmalarına karşın genelde kaspazların dahil olduğu ortak bir yolda birleşir. Kaspaz aktivasyonu iki farklı yolla olmaktadır: Membrandaki ölüm reseptörlerinin aktivasyonuyla başlayan dışsal "extrinsic" yol ve hücresel stres ve sitokrom-c gibi mitokondrial proteinlerin serbest kalmasıyla aktive olan içsel "intrinsic" yol (Loro ve ark 2005, Thorburn 2004).

1.4.1. Fas (CD95)-Fas Ligand (CD95-L) İlişkisi

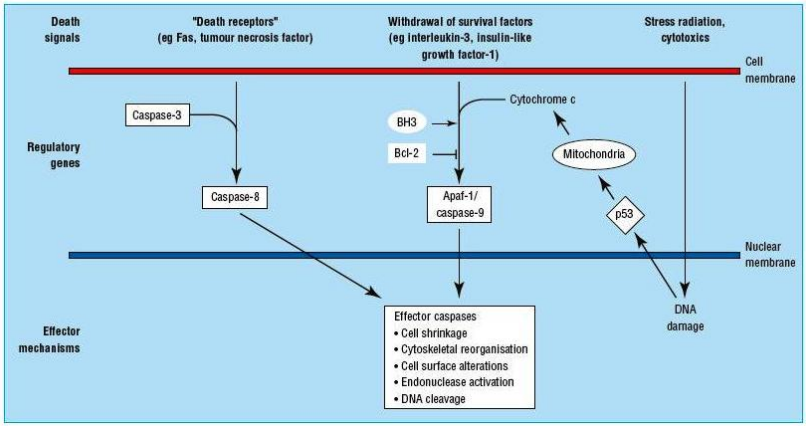
Apoptozisin işleyişi hücre zarı üzerinde bulunan ölüm reseptörlerini aktivasyonu ile ilişkilidir (Resim 1.3). Bir ölüm reseptörü olan Fas; 48kD'luk, APO-1 veya CD95 olarak da bilinen, tip-1 membran proteinidir ve TNF reseptör ailesinin bir üyesidir. Enflamasyon, proliferasyon, anti-viral aktivite ve hücre ölümü gibi birçok biyolojik cevaptan sorumlu olan TNFR ailesi yaklaşık 20 üyeden oluşmaktadır. Fas reseptörü hücre dışındaki "N-terminus" bölgesinde üç tane sisteinden zengin, ligandına bağlanması için gerekli transmembran domeyni ve bir de ölüm domeynini içeren stoplazma içi domeyne sahiptir. Fas geni koromozomun 10q23 bölgesinde bulunmaktadır. Aktive olmuş lenfositlerden yüksek miktarda salınan Fas, ayrıca lenfoid ve lenfoid olmayan çeşitli hücrelerden, neoplastik dokulardan ve tümör hücrelerinden de üretilmektedir. Timus, karaciğer, kalp ve böbrekte de çok miktarda eksprese edilmektedir (Nagata ve Golstein 1995, Israels ve Israels 1999, Timmer ve ark 2002, Dzietko ve ark 2008).

Fas-ligand (CD95-L/Fas-L) hedef hücrelerdeki reseptörlerine bağlanarak hücresel çoğalma "proliferasyon" ve farklılaşma "diferansiyasyonu" düzenleyen 40 kD'luk bir sitokindir. TNF süper ailesinin bir üyesidir, 281 aminoasitten oluşur ve tip-2 membran proteini olarak sentezlenir (Linkermann ve ark 2003). Fas-ligandın Fas reseptörüne bağlanmasıyla apoptozis başlar ve TNFR-1'e bağlanmasıyla benzer

olaylar şekillenir. Fas-ligand geni kromozomun 1q36 bölgesinde konumlanmıştır ve baskın olarak aktive T lenfositlerden ve doğal öldürücü hücrelerden salınır. Fas ve TNFR-1'in sitoplazmik uzantısı, bir ölüm alanını "Death Domain" içerir. Fas'ın sitoplazmik bölümü FADD "Fas associating protein with a Death Domain protein" ve reseptör etkileyici protein "Receptor Interacting Protein" ile etkileşimdedir. Ölüm alanlarını içeren bu TNFR ilişkili protein "TNFR-associated death domain protein" ve reseptör etkileyici proteinler; prokaspaz-8'in aktivasyonu ile apoptozisi doğrudan uyarabilir ve aktive olan kaspaz-8 diğer kaspazları aktive eder (Israels ve Israels 1999, Timmer ve ark 2002).

1.4.2. Fas (CD95) İlişkili Apoptozis

T hücre aktivasyonu aktive olmuş T hücrelerinde Fas-L ekspresyonu gerçekleşir. Aktive olmuş T hücreleri Fas eksprese eden hedef hücrelere bağlanarak bu hedef hücreleri öldürebilir. Fas-ligandın Fas reseptörüne bağlanması, reseptörün ölüm domeynlerinin toplanmasıyla apoptozisi arttırır. Fas ilişkili ölüm bölgesi "fas associated death domain" (FADD) ölüm domeyni ve sitosolik ölüm domeyni "cytosolic death domain" olmak üzere iki domeyn içerir. Kaspaz-8 ve FADD reseptörlere bağlanır. Fas, FasL, FADD ve prokaspaz-8'den oluşan bu kompleks ölüm indükleyen sinyal kompleks "death-inducing signalling complex" olarak adlandırılır (Muzio ve ark 1996, Lawen 2003). Reseptörlerin çaprazına FADD bağlanır ve aynı zamanda prokaspaz-8 içindeki domeyne benzer prokaspaz-8'in bağlandığı N-terminal bölgesine bağlanan ölüm efektör domeyn "death effektör domain" içerir. Kaspaz-8 sistein proteaz ailesinin bir üyesidir (Nagata ve Golstein 1995, Muzio ve ark 1996, Garcia-Calvo ve ark 1999). Kaspazlar inaktif halde sentezlenirler ve işlev görebilmeleri için aktive edilmeleri gerekir. Fas mitokondrideki apoptozise sistemine de dahil olur. Tip-1 hücrelerde ölüm indükleyen sinyal kompleksindeki kaspaz-8'in aktivasyonu kolaylıkla gerçekleşir sonrasında kaspaz-3'ün aktivasyonu ile hücre hızla ölüme gider. Tip-2 hücrelerde ölüm indükleyen sinyal kompleksi iyi bir şekilde oluşturulamaz ve hücreler Fas'la indüklenen apoptozise karşı oldukça dirençlidirler. Sonuçta mitokondri ile ilişkili içsel yol devreye girer (Timmer ve ark 2002, Thorburn 2004, Gastman 2001, Lawen 2003).



Resim1.3. Fas ilişkili apoptosiz (Renehan ve ark 2001).

İçsel yol oksidatif stres, sitotoksik ilaçlar gibi hücre içi ve dışı stresler tarafından aktive edilmiş mitokondriyal yolu içerir. Apoptotik sinyal mitokondri membranında stoplazma içine sitokrom-c salınmasına neden olur ve apoptotik proteaz aktive edici faktör "apoptotic protease activating factor-1" ile apoptozomu oluşturur. Bu kompleks her biri yedişer tane olan apoptotik proteaz aktive edici faktör-1, sitokrom-c, ATP ve prokaspaz-9'dan oluşur. Apoptozomun başlatıcı kaspazı olan prokaspaz-9'un aktive edilmesi efektör kaspaz olan kaspaz-3'ü aktive ederek apoptotik zinciri başlatır (Lawen 2003). Memelilerde tanımlanan farklı görevleri bulunan kaspazlar vardır ve bunlar iki gruptan oluşurlar. Birinci grupta düzenleyici veya uzun prodomeynli kaspazlar (kaspaz-1, -2, -4, -5, -8, -9, -10, -11, -12) ve ikinci grupta ise efektör veya kısa domeynli kaspazlar (-3, -6, -7, -14) yer alır. Kaspazlar prodomainlerine göre farklı yollarla aktive olurlar. Grup 2 kaspazlar sitotoksik reseptörlerin ölüm domeyni ile aktive olurlar. T lenfositler kaspazları aktive edebilir ve prokaspaz-3, arjinin-glisinaspartat peptidlerine bağlanarak aktive olabilir (Pinton ve ark 2001, Ferrari ve ark 2010).

1.4.3. Apoptozis ve Periodontal Hastalık

Apoptozis ve periodontal hastalıkla ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Böbrek transplantasyonu uygulanmış ve siklosporin kullanan bireylerde ilaca bağlı dişeti büyümeleri görülen hastalar ve ilaç kullanmayan gingivitisli bireylerin dişeti dokuları keratinosit apoptozu yönünden kıyaslanmış ve gruplar arası fark bulunamamıştır (Alaaddinoğlu ve ark 2005). Ancak, böbrek transplantasyonu geçirmiş siklosporine bağlı dişeti büyümeleri olan hastalar ve sistemik olarak sağlıklı

bireylerin dişeti dokularının keratinosit apoptozisi yönünden incelendiği diğer bir çalışmada gruplar arası fark bulunmuştur (Bulut ve ark 2005). Ayrıca, nifedipine bağlı dişeti büyümelerinde görülen epitelyal hiperplazinin keratinasit proliferasyonundan ziyade apoptozis mekanizmasının baskılanması yoluyla hücrelerin ömrünü uzatmasına bağlı olduğu rapor edilmiştir (Shimizu ve ark 2002). İmirzalıoğlu ve ark (2005) salya örneklerini değerlendirdikleri çalışmada sigaranın anti-apoptotik mekanizmayı arttırabileceğini rapor etmiştir. Periodontal ligament hücrelerinin değerlendirildiği bir başka araştırmada ise spesifik pro-apoptotik fibronektin parçalarının apoptozisle ilişkisi olabilen proteinaz salınımını düzenleyerek periodontal doku yıkımına katkıda bulunabileceği saptanmıştır (Jee ve ark 2004).

Konak savunma sistemi ile içsel "endojen" ve dışsal "ekzojen" mikrobiyal ajanlar arasında dengesizlik olduğunda periodontal hastalık gelişir. Gingivitisli veya periodontitisli bireylerde hücre ölümü/proliferasyon oranı gingival sulkusun apikal kısmının derinliklerinde en yüksek düzeyde bulunmuştur. Periodontal patojenler lökotoksinler, lipoproteinler ve lipopolisakkaritler gibi hücre ölümünü arttıran ürünlerin salınımı ve enflamatuvar hücrelerden yıkıcı sitokinlerin ve lizozomal enzimlerin üretimini uyararak yıkıma neden olurlar (Loro ve ark 2005). Nötrofillerin sağlıklı gingival sulkusta, hastalıklı alanlarda ve tükrükteki ölüm mekanizmalarını inceleyen bir araştırmada her üç alandaki nötrofillerin yaklaşık %30'unun ölü olduğu ve sadece %1'inin apoptotik olduğu bulunmuştur. Sonuçlara göre her üç alandaki nötrofiller apoptozisle değil nekroz ile ölmektedir (Crawford ve ark 2000). Ancak, nötrofil apoptozisi erken enflamatuvar cevabın süresinin kontrolünde önemlidir ve böylece nötrofilerin uzun süre aktive kalmalarını engelleyerek lokal doku hasarının sınırlı kalması sağlanır. Granülosit monosit stimulating faktör ve TNF-α gibi çeşitli pro-enflamatuvar sitokinlerin Bcl-2 proteinlerinin düzeyini değiştirerek nötrofil apoptozisinin gecikmesinde rol oynadığı bilinmektedir (Sharma ve Pradeep 2006).

Periodontal hastalıkta apoptozisle ilişkili farklı çalışmalarda farklı sonuçlar bulunmuştur. Gamonal ve ark (2001) yaptıkları çalışmada kronik periodontitisli bireylerde sağlıklı bireylere göre apoptozisin daha fazla görüldüğünü göstermişlerdir. Ayrıca apoptozise uğrayan periodontal dokulardaki hücrelerin çoğunluğunu nötrofillerin oluşturduğuna dikkat çekmişlerdir. Ayrıca, enflamasyonlu alanlarda

mikrobiyal ve konağa ait faktörlerin periodontal dokulardaki apoptozisi arttırdığı ve kronik periodontitiste görülen doku yıkımının bir kısmından da apoptozisin sorumlu olduğu gösterilmiştir (Gamonal ve ark 2001).

Gingivitis ve periodontitisli hastalarda gingival keratinositlerin apoptotik ve proliferatif özellikleri incelendiğinde sadece periodontitis grubunda ceplerin en apikal bölgesinde apoptotik hücre sayısı proliferasyondan fazla bulunmuştur (Jarnbring ve ark 2002). Yine gingivitis ve periodontitisli bireylerden elde edilen gingival biyopsilerin apoptotik belirteçler yönünden incelendiği bir diğer araştırmada sadece periodontitis biyopsilerinden elde edilen enflamatuvar sıvıda bu belirteçlere rastlanmıştır (Gamonal ve ark 2003). Agresif periodontitisli bireylerde apoptozisin geciktiği ve sonuçta mevcut enflamatuvar hücrelerin sayısının artmasıyla hızlı bir periodontal yıkımın gerçekleşebileceği belirtilmiştir (Bulut ve ark 2006). Apoptotik nötrofiller *Porphyromonas gingivalis* lipopolisakariti ile uyarılan monositlerde fenotipi değiştirerek onların pro-enflamatuvar sitokin üretimini engelleyip anti-enflamatuvar sitokin üretimini sağlamıştır (Berker ve ark 2005). *Porphyromonas gingivalis* bakteriyel proteolitik aktivite ve klasik apoptotik yolaklardan farklı olarak protein kinaz A ve apoptozis indükleyici faktör yoluyla fibroblast apoptozisini arttırmıştır (Desta ve ark 2007). Kumamoto ve ark (2001) yaptıkları çalışmada diş germlerini, iyi huylu "benign" ameloblastomaları ve kötü huylu "malign" ameloblastomaları apoptozis ile ilişkili Fas, Fas-ligand, kaspaz-3 ve tek zincirli DNA yapıları yönünden incelemişlerdir. Diş germlerine göre Fas-L ekspresyonu iyi huylu ameloblastomalarda benzer olmasına rağmen Fas reseptörleri daha az sayıda gözlenmiştir. Kötü huylu ameloblastomalarda ise Fas-L expresyonu artmış olmasına karşın, Fas reseptör ekspresyonları çok düşük düzeylerde saptanmıştır. Bu durum malign hücrelerin immün sistemin hücre ölüm sinyallerinden nasıl kurtulabildiklerini gösteren bir örnektir. Apoptotik reaksiyonlar kötü huylu ameloblastomalarda iyi huylu olanlara göre daha az sıklıkta gözlenmiştir. Hücre döngüsü "turn-over" malignitelerde bozulduğu saptanmıştır. Araştırma sonuçları apoptozis ile ilişkili faktörlerin epiteliyal odontojenik tümörlerin onkogenezisi ve hücre farklılaşmasında rol oynadıklarını göstermektedir (Kumamoto ve ark 2001). Sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada apoptozisin ortodontik remodelasyon sonrasında ağız dokularında bulunan osteoklastların ortamdan uzaklaştırılması "clearance" üzerindeki etkisini araştırılmıştır. Dört farklı periodontal bölgeden alınan örneklere göre alveoler

kemikteki remodelasyon sonrasında osteoklastların çoğunlukla apoptozis ile yıkıma uğradıklarını göstermişlerdir (Noxon ve ark 2001). Periodontal dokuların yaşlanma ile apoptozise gösterdikleri değişiklikler konusunda da araştırma yapmış ve bu amaçla değişik yaş gruplarından seçtikleri farelerin periodontal dokuları incelenmiştir. Araştırma sonuçları epitel katlarında hücre davranışları yönünden yaşa bağlı farklılık olmadığını, benzer sonuçların mukoza altındaki bağ dokusu proliferasyonu açısından da geçerli olduğunu, ancak yaşlanma sonucu oral ve birleşim epitelinin bağ dokusundaki apoptoz artışı ile hücresel elemanların azaldığı gözlenmiştir. Bağ dokusundaki hücresel elemanların yaşlanmaya bağlı dişeti çekilmesi ve birleşim epitelinin apikale doğru yer değiştirmesinin nedeni olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca yaşlanmaya bağlı periodontal hastalık yatkınlığı da aynı görüş ile açıklanabilir (Sakai ve ark 1999).

1.4.4. Apoptozis, Nitrik Oksit ve Sitokinler

Apoptozis, mitokondrial permeabilite üzerinde peroksinitrit etkisiyle doğrudan ya da poli-adenozindifosfat-riboz sentaz aktivasyonuyla DNA hasarı yoluyla düzenlenir. Reaktif oksijen türlerindeki artış NO'e bağlı apoptoziste önemli unsurlardan birisidir (Clemens 1999, Simon ve ark 2000, Chae ve ark 2003). Özellikle Cu-Zn süperoksid dismutaz gibi hücresel antioksidan sistemlerin düzeyindeki azalma NO'e bağlı apoptotik cevabı arttırırken, mitokondrial Mn süperoksid dismutazın aşırı ekspresyonu bu cevabı baskılar. Reaktif oksijen türlerinin NO'e bağlı apoptozisi arttırdığı bilinmekle birlikte peroksinitrit üretimindeki rollerinden başka etkiler de vardır (Brüne ve ark 1998, Clemens 1999). Örneğin peroksinitrit'e bağlı artan H_2O_2 NO'nun apoptotik etkisini arttırken, *N*-asetil sistein bu etkiyi baskılar. Genel olarak ROT ve NO mitokondrial permeabilite geçişinde sinerjistik etki göstererek apoptozisi düzenlerler (Balakirev ve ark 1997, Clemens 1999). Ancak, NO oranındaki azalma ile birlikte kaspaz-3 aktivitesinin baskılanabilir ve buna bağlı olarak apoptozis durdurulabilir. Kaspaz aktivitesi üzerine etkilerine ek olarak, yüksek ve devamlı seviyelerdeki NO, ısı şok protein 70 "heat shock protein-70" indükleyerek tümör nekroz faktör'e bağlı apoptozisten koruyabilir (Clemens 1999). Nitrik oksit hücresel "turnover"ı durdurucu etkisinin yanında kollajenin yeniden organize olmasına da izin verir (Väisänen-Tommiska 2008).

Apoptozis, enflamatuvar durumlar esnasında hücre ölümünün önemli bir mekanizmasıdır. Aşırı apoptozis, nötrofil migrasyonu ve hepatosit ölümünü kontrol ederek nekrotik hücre ölümünü tetikleyebilir. Çünkü enflamasyonu arttıran uyaran aynı zamanda hepatositlerde iNOS'u da arttırır ve NO üretimi, apoptozisin oranını kontrol etmek için kendini sınırlayan bir mekanizma oluşturabilir. DNA hasarlı hücrelerde apoptozisi indükleyen p53, iNOS'un ekspresyonunu azaltır. Böylece, NO enflamasyona bağlı apoptozise DNA hasarına bir etkisi olmadan karşı koyabilir (Clemens 1999).

Nitrik oksit'in makrofajlar, mezenşimal hücreler, kondrositler, pankreatik β hücreleri, nöronlar gibi farklı hücre sistemlerinde apoptozisi arttırdığı bilinmektedir (Hortelano ve ark 1999, Vieira ve Kroemer 2003, Clemens 1999, Chapple ve Matthews 2007, Väisänen-Tommiska 2008). Ancak, endotelyal ve glomerular hücreler gibi bazı hücre tiplerinde NO'ya bağlı hücre ölümüne direnç geliştirdiği rapor edilmiştir (Manderscheid ve ark 2001). Literatürde bakteri hücre duvarı ürünleri ve proinflamatuar sitokinlerin timositler, makrofajlar, mezenşimal hücreler gibi farklı hücre tipinlerini etkileyerek iNOS tarafından NO ekspresyonunu ve buna bağlı olarak apoptozisi arttırdığı saptanmıştır (Cui ve ark 1994, MacMicking ve ark 1997, Hortelano ve ark 1999, Druzhyna ve ark 2005, Xie ve ark 1996, Arstall ve ark 1999, Sagoo ve ark 2004, Ing ve ark 1999, Størling ve ark 2005). Sıçanlarda mezanşimal hücrelerin "IL-1β'e ilave bFGF" ve "IL-1α'ya ilave TNF-α" gibi uyaranlara karşı daha fazla NO ürettiği ve "hücresel apoptozis baskılayıcısı"'nı da azaltarak apoptozise bağlı hücre ölümünde artış gösterdiği tespit edilmiştir (Manderscheid ve ark 2001). Liu ve ark (2000) insan β hücrelerinde IL-1β, IFN-γ ve TNF-α'nın NO'dan bağımsız olarak apoptozisi arttırdığını rapor etmiştir. Ancak, literatürde buna zıt olarak sitokinlerin normal hücrelerde görülen apoptozisi azalttığı (Lotem ve Sachs 1999) ve sitokin üretiminin baskılanmasıyla kanser hücrelerinde apoptozisin arttırılarak kanser terapisinin olumlu yönde etkilenebileceği de gösterilmiştir (Lotem ve Sachs 1999).

1.5. Sistemik Hastalıklar ve Periodontitis

Periodontitis, birincil etkeni mikrobiyal dental plak olan bir çok unsurun etkilediği "multifaktoriyel" karakterde bir hastalıktır. Konağa bağlı savunma sistemindeki farklılıklar, sistemik ve genetik etkenler, bölgesel olarak plağın mikrobiyal içeriği gibi kazanılmış ve çevresel risklerin etkisi altında hastalığın yıkım şiddetinde değişiklikler olur (Pihlstrom 2001, Carranza ve ark 2007).

Periodontal hastalık oluşumunda birincil etken olan çevresel, davranışsal veya biyolojik olarak hastalığın seyrini değiştirebilen durumlar *"risk faktörleri"* olarak tanımlanır. Uzun süreli takip "longitudinal" çalışmalarla ortaya konarak hastalığın nedensel ilişkisi açıklanabilir. Tütün kullanımı, diyabet, patojenik bakteriler, mikrobiyal diş depozitleri *risk faktörleri* olarak tanımlanmıştır. Periodontal hastalık oluşumunda değiştirilemeyen genetik faktörler, yaş, cinsiyet, sosyoekonomik durum, stres gibi etkenler *"determinant"* olarak tanımlanır. Hastalıkla ilişkili olası veya şüpheli olan faktörler *"risk indikatörleri"* olarak tanımlanır. Kısa süreli "crosssectional" çalışmalarda gözlenir. Osteoporoz, HIV/AIDS, diş hekimine düzensiz gitme *"risk indikatörleri"*dir. Hastalığa neden olabilecek faktörün hastalık etkenlerinden birisi olduğu her zaman gösterilemiyorsa *risk belirteci* "*markerları*" veya "*prediktör*" olarak tanımlanır. *"Risk belirteç veya prediktörleri",* önceden geçirilmiş periodontal hastalık hikayesi ve sondlamada kanama gibi etkenlerdir (Nunn 2003, Pihlstrom 2001, Carranza ve ark 2007).

Diyabet gibi endokrin hastalıklar, nötrofil fonksiyonunu etkileyen hastalıkları da içine alan hematolojik problemler, kardiyovasküler hastalıklar, insan immün yetmezlik virüsü "human immunodeficiency virus" enfeksiyonu, osteoporoz, obezite gibi çeşitli sistemik problemlerin periodontal hastalığın seyrini değiştirebileceği belirtilmektedir (Seymour ve ark 2003, Heitz-Mayfield 2005, Linden ve ark 2007, Carranza ve ark 2007, Khader ve ark 2009). Özellikle diyabet ve periodontitis arasında çift yönlü bir ilişki olduğu ve tedavilerinin birlikte yapılmasının gerekliliği belirtilmektedir (Al-Mubarek ve ark 2002, Tsai ve ark 2002, Campus ve ark 2005 Mealey 2006, Lalla 2007, Carpenter 2010, Benguigui ve ark 2010).

1.6. Diyabet ve Periodontitis

1.6.1. Diyabet Tanımı ve Sınıflaması

Diyabet vücutta çeşitli rahatsızlıklara hatta ölüme yol açabilecek endokrinolojik bir hastalıktır. Dünya nüfusunun yaklaşık %6'sı diyabet hastasıdır ve bu oranın giderek arttığı rapor edilmektedir (Al Shamsi ve ark 2006). Amerikan Diyabet Birliği (2004) "American Diabetes Association" (ADA) Diabetes mellitus'un (DM), insülin hormonunun sekresyonundaki ve/veya etkisindeki azalmaya bağlı olarak ortaya çıkan karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasında bozuklukla karakterize bir grup metabolizma hastalığı olduğunu tanımlamıştır. Klasik semptomları çok su içme "*polydypsia"*, çok sık idrara çıkma "*polyuria"* ve kilo kaybıdır. Bazen bulanık görme ve çok yemek yeme "*polyphagia"* da bu semptomlara eşlik eder. Diyabet olgularında uzun süren hiperglisemiyle birlikte kan damarları, kalp, göz, sinirler ve böbrek gibi çeşitli organlarda hasar meydana gelebilir. Ayrıca, deri, rektum, vajina gibi bölgelerde kaşıntı olabilir, genel olarak güç kaybı ve yorgunluk hissi de görülebilir (American Academy of Periodontology 2000, ADA 2004).

Diabetes mellitus etiyolojisi göz önünde bulundurularak Amerikan Diyabet Birliği "*American Diabetes Association"* (A.D.A.) tarafından şu şekilde sınıflandırılmıştır:

1. Tip 1 diyabet:

a. Bağışıklıkla ilişkili, b. İdiyopatik

2. Tip 2 diyabet:

3. Diğer spesifik tipler:

a. β-hücre fonksiyonundaki genetik defektler

1. Kromozom 12, HNF-1α (MODY3), 2. Kromozom 7, glucokinase (MODY2), 3. Kromozom 20, HNF-4α (MODY1), 4. Kromozom 13, insulin promoter factor-1 (IPF-1; MODY4), 5. Kromozom 17, HNF-1α (MODY5), 6. Kromozom 2, *NeuroD1* (MODY6), 7. Mitokondrial DNA, 8. Diğerleri

b.İnsülin aktivitesindeki genetik defektler

1. Tip A insulin direnci, 2. Leprechaunizm, 3. Rabson-Mendenhall sendromu, 4. Lipoatrofik diyabet, 5. Diğerleri

c. Ekzokrin pankreas hastalıkları

1. Pankreatitis, 2. Travma/pankreatektomi, 3. Neoplazi, 4. Kistik fibrozis, 5. Hemokromatozis, 6. Fibrocalculous pankreatopati, 7. Diğerleri

d. Endokrinopatiler

1. Akromegali, 2. Cushing's sendromu, 3. Glucagonoma, 4. Pheochromocytoma, 5. Hiperthyroidizm, 6. Somatostatinoma, 7. Aldosteronoma, 8. Diğerleri

e. İlaç ve kimyasal maddelere bağlı gelişen DM

1. Vacor, 2. Pentamidine, 3. Nikotinik asit, 4. Glukokortikoidler, 5. Thyroid hormone, 6. Diazoxide, 7. β-adrenergic agonists, 8. Thiazides, 9. Dilantin, 10.α - İnterferon, 11. Diğerleri

f. Enfeksiyonlar

1. Konjenital rubella, 2. Sitomegalovirus, 3. Diğerleri

g. Bağışıklıkla ilişkili diyabetin sık görülmeyen tipleri

1. "Stiff-man" sendromu, 2. Anti-insulin reseptor antikorları, 3. Diğerleri

h. Diyabetle ilişkisi olabilen diğer genetik sendromlar

1. Down's sendromu, 2. Klinefelter's sendromu, 3. Turner's sendromu, 4. Wolfram's sendromu, 5. Friedreich's ataksia, 6. Huntington's chorea, 7. Laurence-Moon-Biedl sendromu, 8. Myotonic distrofi, 9. Porphyria, 10. Prader-Willi sendromu, 11. Diğerleri

4. Hamilelikte görülen diyabet "Gestational diabetes mellitus" (ADA 2004).

Diyabetin en sık görülen tipleri Tip 1, Tip 2 ve hamilelikte görülen diyabettir. Tip 1 DM, çoğunlukla çocuklarda ve gençlerde görülür. Tüm DM tiplerinin % 5-10'unu oluşturur, daha çok beyaz ırkta rastlanır. Tip 1 DM için önceleri; juvenil-onset diabetes, Tip I DM, insüline bağlı diyabet "*insulin dependent diabetes mellitus"* (IDDM) terimleri kullanılmıştır (ADA 2004). Tip 1 DM'nin bağışıklıkla ilişkili ve idyopatik olmak üzere iki formu vardır. Tip 1 DM'nin vakalarının çoğu pankreastaki insülin üreten Langerhans adacıklarının otoimmun yıkıma uğraması nedeniyle insülin üretememesi sonucu gelişir. Pankreas β hücresinin çeşitli komponenetlerine karşı adacık hücresi otoantikorları, insülin antikorları, glutamik asit dekarboksilaz antikorları ve tirozin fosfataz antikorları gibi otoantikorlar oluşmuştur. Bu otoantikorlar hastaların büyük bir kısmında tanı sırasında tespit edilirler. Hiperglisemik durum ilk kez ortaya çıktığında bu otoantikorların birine veya daha fazlasına % 85-90 oranında rastlanır. Vakaların çoğu 20 yaşından önce oluşur, β hücrelerindeki yıkım yeni doğanlarda ve çocuklarda hızlı olmasına rağmen, yetişkinlerde daha yavaş gelişir. Adacık hücrelerine ve insüline karşı gelişmiş antikorlar sıklıkla pozitiftir ve Graves hastalığı, Hashimoto tiroiditi, Addison hastalığı ve pernisiyoz anemi gibi otoimmun hastalıklar bu tabloya eşlik edebilir. Bazı çocuklarda ve gelişme çağındakilerde ketoasidoz hastalığın ilk belirtisi olarak ortaya çıkmasına rağmen, diğer bazı hastalarda hiperglisemik durumun ani olarak kötüleşmesi sonucu veya enfeksiyona bağlı olarak gelişebilir (ADA 2004, O'Keefe ve ark 2006). Tip 1 diyabetli hastalar diyabetik ketoasidoz gelişimine yatkındır. Hastaların çoğu normal kilodadır. İnsülin seviyesinin yetersiz olduğu durumlarda dolaşımdaki glikoz hücrelere taşınamadığı için hücrelerin enerji ihtiyacını karşılayabilmek amacıyla vücuttaki yağ hücreleri lipoliz yolu ile yıkılır ve serbest yağ asitleri oluşur. Oluşan serbest yağ asitleri keton cisimlerine dönüşür. Keton cisimlerinin artması sonucu dehidratasyon ve bikarbonat tamponlama kapasitesinde değişiklikler görülür ve diyabetik ketoasidoz gelişir. Diyabetik ketoasidozda semptomlar arasında aşırı idrara çıkma, susama, bulantı, kusma ve abdominal ağrı vardır (ADA 2004, O'Keefe ve ark 2006).

Tip 2 DM, tüm DM tiplerinin %90-95'ini oluşturur. Önceki sınıflamalarda Tip 2 DM için erişkin tip DM, Tip II DM, insülinden bağımsız diyabet *"non-insulin dependent diabetes mellitus"* (NIDDM) isimleri de kullanılmıştır. Genellikle 40 yaş üstü bireylerde görülür (ADA 2004, O'Keefe ve ark 2006). Hastalıktan etkilenen

bireylerin çoğu obezdir ve pankreasın β hücrelerinde otoimmün yıkım görülmez. Tip 2 DM etkenlerinden biri olan obezitenin yaygınlaşmasından dolayı günümüzde çocuklarda görülme sıklığı artmıştır. Tip 2 DM insülin üretilememesi sonucu değil, insülin direnci ve insülin yetersizliğine bağlı olarak gelişir. Tip 2 diyabet insülin direnciyle birlikte, pankreasın yeterli miktarda insülin salgılayamaması sonucunda gelişir. Pankreas insülin üretmeye devam eder, ancak insüline duyarlı dokuların insüline direnç kazanması sonucu aktivitesi azalır. Tip 2 DM'nin gelişmesi yavaştır, hastalığın başlangıç aşamasında klasik semptomlar çok belirgin olmadığı için, uzun yıllar fark edilmeden ilerleyebilir. Genetik yatkınlığın yanında ilerlemiş yaş, fazla kilo alımı ve hareketsizlik diyabete yakalanma riskini arttırmaktadır (ADA 2004, O'Keefe ve ark 2006, Mealey ve Ocampo 2007, Xu ve ark 2008).

Hamilelikte görülen diyabet, hamilelik döneminde ortaya çıkan veya ilk kez bu dönemde fark edilen glikoz tolerans bozukluğu olarak tanımlanır (ADA 2004). Bu terim tedavi için insülin veya sadece diyet uygulanan hastalarda ve yine bu durumun gebelik sonrasında devam edip etmemesine göre bakılmadan kullanılır. Genellikle ikinci ve üçüncü trimesterde gelişir. Fetal morbidite ve mortaliteyi önlemek için insülin tedavisi gerekli olabilir. Tip 2 DM'de olduğu gibi insülin direncinin artması sonucu gelişir. Hastaların çoğunda doğum sonrası glisemik durum normale dönerken, %35'inde 5-10 sene içinde Tip 2 DM gelişmektedir (O'Keefe ve ark 2006, Huidobro ve ark 2010). Normal kiloda ve Tip 2 DM görülme sıklığı fazla olan etnik gruplara mensup olmayan, ailesinde DM geçmişi olmayan, gebelik öncesinde anormal glikoz metabolizması olmayan ve 25 yaşın altındaki kadınlarda gestasyonel DM görülme sıklığı daha azdır (ADA 2004).

1.6.2. Diyabetin Tanısı

Diyabet tanısının konulmasında venöz kan glikoz seviyesi esas alınmaktadır. Tanı konulurken aşağıda belirtilen testlerden herhangi biri veya birkaçının sonucunun pozitif çıkması durumunda hastaya DM teşhisi konur. Ancak test veya testler takip eden günlerde tekrarlanmalıdır.

Diyabetin tanı kriterleri:

1) Sık idrara çıkma, çok yemek yeme, fazla su içme ve sebebi açıklanamayan kilo kaybı gibi DM semptomları ile birlikte günün herhangi bir saatinde en son

öğünden geçen zamana bakılmaksızın ölçülen plazma glikoz düzeyinin ≥ 200 mg/dl (11,1 mmol/l) olması,

2) En az sekiz saatlik açlık sonrası plazma glikoz seviyesinin ≥ 126 mg/dl (7,0 mmol/l) olması,

3) Glikoz yüklemesi (75g) ile yapılan oral glikoz tolerans testi sonrasında ikinci saat plazma glikoz seviyesi değerinin ≥ 200 mg/dl (11,1 mmol/l) olması (ADA 2004).

DM açısından yüksek risk taşıyan bireylerde belirli aralıklarla oral glikoz tolerans testi yapılmalıdır. Bu test karbonhidratlara karşı tolerans durumunu belirlemek için Tip 2 DM ve bozulmuş glikoz toleransı tanısında kullanılır ve 9-16 saatlik açlık sonrası 300 mL suda eritilmiş 75 g glikozun 5 dakikada içirilmesi ve 2 saat boyunca her 30 dakikada bir kan örneği alınması ile yapılır.

Açlık plazma glikozu ölçümleri değerlendirilmesi:

1) Normal < 100 mg/dl (5,6 mmol/l)

2) Bozulmuş açlık glikozu = 100-125 mg/dl (5,6-6,9 mmol/l)

3) DM ≥ 126 mg/dl (7,0 mmol/l). Ancak oral glikoz tolerans testi ile bu sonuçlar desteklenmelidir.

Oral glikoz tolerans testi ikinci saat plazma glikozuna bakılarak;

1) Normal < 140 mg/dl (7,8 mmol/l)

2) Bozulmuş glikoz toleransı = 140-199 mg/dl (7,8-11,1 mmol/l)

3) DM ≥ 200 mg/dl (11,1 mmol/l) değerlendirilir (ADA 2004).

Tarama testleri üç yılda bir yapılmalıdır; 45 yaş üzeri ve ek risk faktörü taşıyan kişilerde daha sık tekrarlanmalıdır (ADA 2004, O'Keefe ve ark 2006). DM tanısının konulmasında yararlanılan veya hastanın kısa dönemde kontrol altında olup olmadığını gösteren bu testlerin yanı sıra son 30-90 gün içindeki metabolik kontrolünü belirlemek amacıyla Hemoglobin A1c (HbA1) seviyesi testi de kullanılmaktadır. Bu testle kanda hemoglobin molekülüne geri dönüşümsüz olarak

bağlanan glikoz seviyesi ölçülür (Mealey ve Oates 2006). Hemoglobin A karbonhidratlara bağlanarak glikozile olur ve glikozillenmiş hemoglobin adını alır. HbA1'in pek çok formu vardır. Bunların içinde % 60-80 oranıyla en fazla olan HbA1c'dir. HbA1c seviyesinin referans aralığı sağlıklı bireylerin HbA1c değerlerinin istatistiksel değerlerine bakılarak oluşturulur, bu yüzden testin yapıldığı laboratuvara göre ve kullanılan metoda göre farklılık gösterebilir. HbA1 seviyesi <%6 olanlar normal seviye, kontrol altındaki diyabetiklerde tedavi hedefi HbA1c <7'dir. Yetersiz kontrol altında olan diyabetiklerde HbA1c >8 glisemik kontrolü iyileştirmek için hekimin müdahelesi şarttır ve diyabetik komplikasyon riski yüksektir (Mealey ve Oates 2006).

Diyabetin metabolik kontrolünün takibinde HbA1'e ilave olarak glikozillenmiş albuminin seviyesi de ölçülür. Fruktozamin testi glikozillenmiş albuminin seviyesini ölçer. Serum albumininin yarılanma ömrü 2-3 hafta olduğu için bu test son birkaç hafta gibi daha kısa süreli glisemik kontrolü yansıtır. Hamilelik, yeni tedaviye başlanması ve medikal hastalıklar ve anemi gibi HbA1 ölçümü yapılamadığı durumlarda glikozillenmiş albumin seviyesinin ölçülmesi tercih edilir (Hom ve ark 1998, Mealey ve Oates 2006).

1.6.3. Diyabetin Komplikasyonları ve Patogenezi

Diyabet patogenezinde çeşitli faktörlerin rol oynadığı "multifaktöriyel" bir hastalıktır. Hiperglisemi sonucu DM'li hastalarda insülin duyarlılığı azalır ve hepatik glikoz çıkışı artar, glikoz karaciğerde glikojen halinde depolanamaz. İnsülin seviyesi normal değerlerin altında olduğu zaman dolaşımdaki glikoz tam olarak hücrelere transfer edilemez (Mealey ve Moritz 2003, Holt 2004, Mealey ve Oates 2006). Retinopati, nefropati ve nöropati gibi mikrovasküler komplikasyonlarının yanı sıra periferal damar hastalıkları, kardiovasküler hastalıklar, serebrovasküler hastalıklar gibi makrovasküler problemler ve yara iyileşmesinde gecikme DM'nin klasik komplikasyonlarıdır (Stehouwer ve ark 1997, Lehto ve ark 2000, Marso 2002, Creager ve ark 2003, Mealey ve Moritz 2003, Bloomgarden 2004, Bloomgarden 2005, Ray ve ark 2009).

Diyabetik komplikasyonlar kötü glisemik kontrol ve oksidatif stresle ilişkilendirilmektedir. Nöropati diyabetik her üç hastadan birini etkileyen ve diyabet

süresince insidansı artan bir komplikasyondur. Ayrıca ilerlemiş nöropati çoğu ayak ülseri oluşumu ve ampütasyonunun temelini oluşturur (Kumar ve ark 1998, Chandrasekharan ve Srinivasan 2007, Bhatt ve ark 2009). Hiperglisemi, artmış kan basıncı seviyesi ve genetik yatkınlık nefropati oluşumu için risk faktörleridir. Diyabetik nefropati diyabet hastalarının yaklaşık %40'ında görülmektedir. Mikroalbuminuri ve makroalbunuri olmak üzere kategorize edilmiştir. Diyabetik nefropati böbrek değişimine yol açabilecek kadar ilerleyebilmektedir (Andersen ve ark 1983, Gross ve ark 2005). Kötü glisemik kontrolle birlikte gelişen retinopatiyle görme duyusu olumsuz etkilenmekte ve körlüğe kadar gidebilecek olumsuz sonuçlar doğurabilmektedir (Merime 1997, Dandona ve ark 1999, Temple ve ark 2001, Stirban ve ark 2008). Diyabette görülen anjiyopati oluşumunda endotelyal disfonksiyon önemli yer tutmaktadır (Stehouwer ve ark 1997). Diyabet ve kalp-damar hastalıklarıda ilişkilendirilmiştir. Diyabet damarlarda aterosklerozu hızlandırır ve kan akımı tamamen yetersiz kaldığında ekstremitenin kaybına yol açabilir. Diyabetteki damarsal hastalıklar ayaklarda tedavisi zor ülserlere sebep olabilir (Lehto ve ark 2000, Abbott ve ark 2002, Marso 2002, Creager ve ark 2003, Singh ve ark 2005, Ray ve ark 2009). Diyabetli bireylerde yara iyileşmesinden sorumlu mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir. Enfeksiyona yatkınlıkta rol oynayan değişmiş hücresel aktivitelerin birikimsel "kümülatif" etkilerinin yara iyileşmesini de etkileyebilir. Ayrıca, fibroblastlardan kollajen sentezinin azalması ve diyabetik hastalarda kollajenaz üretiminin fazla bulunması yara iyileşmesinde rol oynar. Bununla birlikte artmış kollajenaz yeni sentezlenmiş az çapraz bağlı kollajeni bozar ve defektif yara iyileşmesini tetikler. Yara iyileşmesinde geç enflamatuvar cevabın diyabetlilerde değiştiği bulunmuştur. Diyabetik hastaların trombositlerinin mitojenik aktivitesini azaldığı belirtilmektedir. Diyabetik hastaların trombositlerinin, diyabetik olmayan bireylere göre daha az fibroblast proliferasyonu indüklediği görülmüştür. Düşük mitojenik aktivite ile azalmış yara dayanıklılığı arasındaki ilişki belirlenmemiştir, ancak birbirleriyle bağlı olabileceği rapor edilmiştir (Schneir ve ark 1984, American Academy of Periodontology 2000).

İnsülin direnci, periferik dokuların insülinle stimüle edilen glukoz alımıyla karakterizedir. Ayrıca, artmış serbest yağ asit üretimi, hepatik glikoz üretimi, insülin düzeyi ve aterosklerotik vasküler hastalıklarla ilişkilidir. Normal glikoz hemostazı olan kişilerle karşılaştırıldığında insülin direnci olan kişiler, kardiyovasküler olaylara

karşı yüksek risk taşırlar (O'Keefe ve ark 2006). Kronik enflamasyonun insülin direncinin patogenezinde önemli bir rol oynadığı kabul edilmektedir. Vücudun enerji ihtiyacı arttığında veya kan glikoz seviyesi yükseldiğinde, hücre yüzeyindeki insülin reseptörleri devreye girer. Dolaşımdaki fazla glikoz uzaklaştırılır ve çoğunlukla yağ dokusunda olmak üzere hücre içinde depolanır. Böylece hücreler insüline direnç kazanırlar. Yüksek glikoz düzeyi pankreastan insülin salgılanmasını bozar ve insülin direnci artar. Glikozun hücre içine girmesini sağlamak için pankreas insülin üretimini arttırır. Hiperglisemik durumun devam etmesi ve insülin üretimindeki artışa bağlı olarak "hiperinsülinemi" oluşur (Holt 2004, Mealey ve Moritz 2003, Mealey ve Oates 2006, Liadis ve ark 2005, Sia ve Hänninen 2006, Thomas ve ark 2009).

Devamlı hiperglisemi nedeniyle proteinler, lipidler ve nükleik asitler glikozile olurlar. Artmış konsantrasyonlardaki glukoz, "Amadori" ürünleri adı verilen glikolizlenmiş artıkları oluşturmak için proteinlerin primer amino grupları ile nonenzimatik reaksiyonlara girer. Bir seri dehidratasyon ve fragmantasyon reaksiyonlarından sonra glikozillenmiş proteinlerden ileri glikozilasyon son ürünleri "*advanced glycation end-products"* (AGE) oluşur (Mealey ve Moritz 2003, Vincent ve ark 2004, Mealey ve Oates 2006). Bu reaksiyonlar geçiş metal iyonları ile katalizlenir. Proteinlerin glikolizlenmesi doğrudan glukoz konsantrasyonu ile ilişkilidir ve bu yüzden zayıf glisemik kontrol ile üretilir. Bazı yiyecekler, diyabetik hastalarda AGE'nin uyardığı stresi arttırabilen AGE'ler içerir ve nefropatiyi tetikler (Cameron ve Cotter 1995, Vincent ve ark 2004). Diyabetli olan veya olmayan herkeste AGE üretimi görülür**.** Ancak, uzun süreli hiperglisemiye bağlı olarak diyabet hastalarında AGE'nin görülme sıklığı daha fazladır (Lalla ve ark 2000, Holt 2004, Mealey ve Moritz 2003, Mealey ve Oates 2006, Stirban ve ark 2008).

İleri glikozilasyon son ürünleri, AGE reseptörü "*receptor for* AGE" (RAGE) olarak bilinen hücre yüzeyi reseptörüne bağlanır. İleri glikozilasyon son ürünlerinin RAGE ile etkileşimi, aktive olmuş NADPH oksidaz için anahtar rolü olan ve hücre yüzeyinde prooksidan molekülleri için yer bulunduran bir mekanizma vasıtasıyla ROT üretimini indükler. İleri glikozilasyon son ürünlerine bağlı ROT üretimi, kan damarı endotelyal aktivasyonu ve diyabetik vasküler komplikasyonlara neden olmaktadır (Wautier ve ark 1994, Vincent ve ark 2004). Kollajende AGE'lerin birikmesi sonucu kollajenin çapraz bağlarında artış görülür ve bunun sonucunda

normal enzimatik yıkımlara ve doku turnover'ına dayanıklı oldukça stabil kollajen makromolekülleri oluşur. Kan damarlarının duvarında biriken AGE tarafından modifiye edilmiş kollajen, damar duvarını kalınlaştırarak lümeni daraltır. İleri glikozilasyon son ürünleri hem santral hem de perifer arterlerde görülebilir (Mealey ve Moritz 2003, Mealey ve Oates 2006, Holt 2004). Damar duvarında bulunan modifiye olmuş kollajen molekülleri dolaşımdaki düşük yoğunluktaki lipoproteinlerle kovalent bağlar oluşturarak ateroskleroza sebep olur. Bu birikim sonucunda damar lümeni daralır ve etkilenen organlarda kan dolaşımı bozulur. Glikozile olmuş proteinler retinada ve glomerulusta da birikir. Biriken AGE ile birlikte retinanın bazal membran kalınlığı artar, glomerulustaki mezenkimal matriks kalınlaşır (Mealey ve Moritz 2003, Holt 2004, Koopman ve ark 2005, Mealey ve Oates 2006). Hücre düzeyinde de AGE'lerin birçok etkileri vardır. Endotel hücrelerinin, nöronların, düz kas hücrelerinin, monositlerin ve makrofajların yüzeylerinde RAGE olarak adlandırılan AGE reseptörleri bulunur. Hiperglisemi sonucunda reseptörler ve AGE-RAGE bağlantıları artar (Mealey ve Moritz 2003, Mealey ve Oates 2006, Holt 2004). Diyabetik hastaların dişeti dokularındaki AGEs ve AGE reseptörü üretiminin de diyabetik olmayanlara göre daha fazla olduğu rapor edilmiştir. Endotelyal hücreler epitelyal hücreler, lenfositler ve monositler gibi çeşitli hücre tiplerinden salgılanan RAGE AGEs'lerin biyolojik etkilerine aracılık eder (Andersen ve ark 2007).

1.6.4. Diyabet ve Sitokinler

Diyabete bağlı dejeneratif değişikliklerin gelişmesinde konak savunma sistemi hücreleri tarafından mikroorganizmalar ve/veya diğer antijenlere karşı üretilen pro-enflamatuvar ve anti-enflamatuvar sitokinlerin önemi üzerinde durulmaktadır. Sitokinler diyabete bağlı nörolojik ve damarsal problemlerin gelişmesinde rol oynayan önemli immun düzenleyicilerdir. Bu enflamatuvar mekanizmaların tip 1 ve tip 2 diyabet gelişiminde anahtar rol oynadıkları belirtilmiştir (Foss-Freitas ve ark 2007, Kristiansen ve Mandrup-Poulsen 2005, Alexandraki ve ark 2006). İnterlökin-1β, TNF α, IL-6, IL-8, IL-12 ve IL-18 gibi sitokinlerin serum konsantrasyonlarının diyabetik bireylerde sağlıklı kontrollere göre daha yüksek düzeylerde bulunduğu ve nöropati, retinopati, nefropati gibi problemlerin oluşmasında etkin oldukları saptanmıştır (Kristiansen ve Mandrup-

Poulsen 2005, Blazhev ve ark 2006, Mirończuk ve ark 2005, Fujita ve ark 2010, Aksünger ve ark 1994). İnsülin direncinin oluşumunda TNF-α ve IL-6 gibi sitokinlerin rol oynayabileceği rapor edilmiştir (Senn ve ark 2002, Gwozdziewiczová ve ark 2005, Kabayama ve ark 2005). Diyabetik kontrolün sağlanmasıyla IL-10 gibi anti-enflamatuvar sitokin düzeylerinin de artış gösterdiği tespit edilmiştir (Foss-Freitas ve ark 2007). Hatta enflamasyonun baskılanmasında etkili olduğu bilinen IL1-reseptör antagonistlerinin DM tedavisinde kullanılabileceği rapor edilmiştir (Donath ve Mandrup-Poulsen 2008, Mandrup-Poulsen ve ark 2010). Diyabetin tedavi ile kontrol altına alındığı olgularda serum HbA1c, CRP, IL-6 düzeylerinin düştüğü rapor edilmiştir (Choudhary ve Ahlawat 2008). Diyabetik sıçanlara uygulana IL-4 gen terapisiyle Tip 1 diyabet oluşumuna karşı koruma sağlandığı rapor edilmiştir (Zipris ve Karnieli 2002). Ancak, farklı dokularda yapılan araştırmalarda çelişkili sonuçlar rapor edilmiştir. Mezenşimal hücrelerden salınan IL-6 miktarının yüksek glikoz konsantrasyonunda düştüğü (Ihm ve ark 2002) ve diyabetik farelerde IL-10 üretimindeki artışının β hücrelerindeki hasarı hızlandırdığı rapor edilmiştir (Wogensen ve ark 1994). İnterlökin-6'nın insülin sinyalini bozduğu ve damar endotelinde NO üretimini arttırdığı belirtilmiştir (Andreozzi ve ark 2007).

1.6.5. Diyabet ve ROT İlişkisi

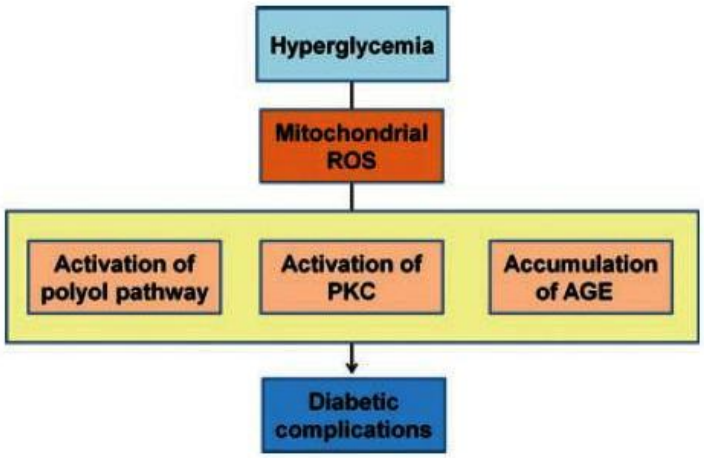
Kontrolsüz diyabet ve hiperglisemi ile birlikte artan süperoksit, hidrojen peroksit ve nitrik oksit gibi ROT'leri takiben polyol, protein kinaz C (PKC) ve mitojen aktive edici kinaz "mitogen activated protein kinase" (MAPK) yolu aktive olur ve artan AGE oluşumuyla beraber oksidatif stres ve oksidatif hasarın arttığı rapor edilmiştir (Cederberg ve ark 2001, Szkudelski 2001, Ceriello 2003, Vincent ve ark 2004, Punithavathi ve ark 2008, Oever ve ark 2010). Bu yolların işleyişi aşağıdaki şekilde olmaktadır:

AGE ile ROT üretimi

Artmış konsantrasyonlardaki glukoz, "Amadori" ürünleri adı verilen glikolizlenmiş artıkları oluşturmak için proteinlerin primer amino grupları ile nonenzimatik reaksiyonlara girer. Bir seri dehidratasyon ve fragmantasyon reaksiyonlarından sonra Amadori ürünleri AGEs olarak bilinen stabil kovalent eklentilere dönüştürülür. Bu reaksiyonlar geçiş metal iyonları ile katalizlenir.

Diyabetik ratların bir geçiş metal şelatörü ile tedavi edilmesi diyabet indüklü sinir iletim eksikliğini engelleyebilir. Proteinlerin glikolizlenmesi doğrudan glukoz konsantrasyonu ile ilişkilidir ve bu yüzden zayıf glisemik kontrol ile üretilir. Bazı yiyecekler, diyabetik hastalarda AGE'nin uyardığı stresi arttırabilen AGE'ler içerir ve nefropatiyi tetikler (Cameron ve Cotter 1995, Vincent ve ark 2004).

İleri glikozilasyon son ürünleri RAGE olarak bilinen hücre yüzeyi reseptörüne bağlanır. Bu reseptör, Ig ailesinin "multiligand" bir üyesidir. Bu bağlanma, p44/p42 MAPKs, NF-κB, p21Ras ve diğer ara ürünleri içeren kademeli bir sinyal transdüksiyon olayını başlatır. İleri glikozilasyon son ürünlerinin RAGE ile etkileşimi, aktive olmuş NADPH oksidaz için anahtar rolü olan ve hücre yüzeyinde prooksidan molekülleri için yer bulunduran bir mekanizma vasıtasıyla ROT üretimini indükler. Nöronal hücre hatlarında AGE'lerin uygulanması glutatyonu azaltır, ancak bu antioksidanların varlığında engellenir. RAGE'e karşı antioksidanlar ve antikorlar, hem oksidatif stresi hemde RAGE bağlanması ile aktive olabilen aşağı akış sinyal yollarını engeller. İleri glikozilasyon son ürünlerine bağlı ROT üretimi, kan damarı endotelyal aktivasyonu ve diyabetik vasküler komplikasyonlara neden olmaktadır (Wautier ve ark 1994, Yan ve ark 1994, Vincent ve ark 2004).



Resim1.4. Hiperglisemiyle birlikte doku yıkımına sebep olan mekanizmalar (Araki ve Nishikawa 2010).

Polyol yolu

Aldoz redüktaz enzimi, toksik aldehitleri inaktif alkollere çevirir. Glukoz, aldoz redüktaz için zayıf bir substrattır. Ancak, yüksek konsantrasyonlarda bu enzim

glukozu sorbitole çevirir ve glukozun fruktoza dönüştüren polyol yolunu başlatır. Glutatyon reduktaz gibi, aldoz redüktaz enzimi bir kofaktör olarak NADPH'ye bağlıdır. Bu yüzden aşırı polyol yolu aktivasyonu sitosolik NADPH'yi azaltır ve sonucta glutatyonu azaltır. Ayrıca, sorbitol akümülasyonu, oksidatif stres oluşturan hücresel osmotik stres üretir. Bu yol nöropatiyi içeren diyabet komplikasyonlarına karşı yapılan terapiler için bir hedeftir. Son zamanlarda yapılan insan genetik ve biyokimyasal veriler, artmış diyabet komplikasyon riski ile aldoz redüktaz gen polimorfizimi arasında bir bağ ortaya koymuştur (Stevens ve ark 1993, Vincent ve ark 2004).

Protein Kinaz C aktivasyonu

Protein Kinaz C aktivasyonunun diyabetik nöropatiye katkısı, PKC'nin vaskuler kan akımındaki ve nöronal hücrelere doğrudan etkisinden çok mikrovaskuler hastalıktaki etkisiyle oluşmaktadır. Protein Kinaz C aktivasyonu redoks durumuna göre kendi kendini düzenleyebilecek bazı yapısal özelliklere sahiptir. Prooksidanlar, PKC aktivitesini uyarmak için düzenleyici alanlarla etkileşime girerler. Fakat antioksidanlar PKC'nin katalitik alanı ile ilişkiye girerek onun aktivitesini baskılarlar. Retina, böbrek ve diyabetik sıçanların kılcal damarlarında PKC'nin aktivitesi artar. Ancak, periferal nöronlarda PKC'nin herhangi bir izoformunun değişmiş aktivitesi için bir kanıt yoktur. Bu durum nöron dışındaki hücre tiplerinde lipolitik yol ve diasilgliserol üretiminin PKC aktivasyonunun ana nedenleri olduğunu gösterir. Bir kez aktive olduğunda, PKC, transkripsiyon faktörlerini fosforilleyen MAPK'leri aktive eder ve böylece gen ekspresiyon dengesini değiştirir. Aktive olmuş PKC ile birlikte ısıl şok proteinler artabilir ve JNK gibi stres genleri apoptozise ya da vasküler aterosklerozise neden olabilir. Diyabetik sıçanlarda PKCβ baskılanması oksidatif stresi azaltır, kan akımını normalize eder ve sinir iletim eksikliğini azaltır. Yüksek glikoz, endotelyal hücrelerde NF-κB aktivasyonuna, ROT oluşumuna, hücresel aktivasyona ve PKC baskılayıcısı varlığında engellenen bir etkiye yol açar (Vincent ve ark 2004).

MAP Kinaz aktiviteleri

MAP kinazın, ERK1/2, JNK ve p38 tüm üç sınıfı, diyabetik sıçanların dorsal ganglion kökünde aktive olurlar. Bu sinyal yollarının diyabetik nöropatinin

gelişimindeki önemi net değildir. Antioksidanlarla tedavi ERK'lerin aktivasyonunu azaltırken, JNK'nın aktivasyonunu arttırır. Bu durum ERK'lerin hasar verici, JNK'nin ise koruyucu olduğunu gösterebilir. Yinede JNK'nın devamlı aktivasyonu normal olarak hasar ile ilişkilidir. Peroksinitrit indüklü oksidatif stres nöroblastoma hücrelerinde p38'i aktive eder ve bu durum büyümenin durmasına ve apoptozise neden olur (Vincent ve ark 2004).

1.6.6. Diyabet ve NO, iNOS Üretimi

Diyabet oluşumu ve gelişimi sırasındaki olayların oksidatif stresle ilişkili olduğu belirtilmiştir (Watts ve Playford 1998, Dias ve ark 2005, Keaney ve Loscalzo 1999, Jakus 2000, West 2000, Vincent ve ark 2005). Metabolik olayların normal bir yan ürünü olan O_2^-, glikolizde, elektron transferi ve oksidatif fosforilasyonda, kronik veya akut olarak aşırı yüklenir. Aşırı O_2^- oksidatif stres oluşturur (Vincent ve ark 2005). Bozulmuş glukoz toleransı gösteren hastalarda oksidatif hasarla birlikte nöropati olduğu ve kısa hiperglisemik episodların varlığında ROT oluşumunun önlenmesinin kısmende olsa diyabetik nöropatinin gelişimi ve oksidatif hasarı engelleyebileceği belirtilmiştir (Vincent ve ark 2004, Vincent ve ark 2005).

Mitokondrideki oksidatif stres, enerji düzenlenmesini kritik şekilde değiştirir ve idame en az üç mekanizma yardımıyla olur. Birincisi NO'nun fizyolojik seviyeleri, moleküler oksijen ile sitokrom-c oksidaza bağlanma konusunda geri dönüşümlü olarak yarışır, geri dönüşümlü olarak baskılar ve elektron transferi için anahtar rol oynar. Buna zıt olarak aşırı O_2^- varlığında, NO, $ONOO^-$'ye dönüşür ve moleküler oksijenle sitokrom-c oksidaza geri dönüşümsüz olarak bağlanma için yarışır. Böylece $ONOO^-$ mitokondriyel fonksiyonu etkiler ve ATP üretimini engeller. İkincisi, aşırı O_2^- ve $ONOO^-$ üretimi nedeniyle oluşan oksidatif stres mitokondri için esansiyel proteinlerin içeri girmesini baskılar. Son olarak, iç membran proteinlerinin oksidatif hasarı membran geçirgenliğini arttırır (Vincent ve ark 2005).

Diyabetik olgularda çeşitli organlarda iNOS düzeyinin arttığı (Spitaler ve Grarier 2002, Liu ve ark 2008) ve insülin salgılayan hücrelerinin fonksiyonunun nitrik oksit tarafından baskılanabildiği rapor edilmiştir (Corbett ve ark 1993, Sjöholm ve ark 2000). Diğer taraftan streptozotosin ile diyabet oluşturulmuş sıçanların serebrokorteksinde NO seviyesinin azaldığı belirtilmiştir (Yu ve ark 1999).

Diyabet durumunda çeşitli organlarda görülen problemlerin çoğu bir reaktif oksijen türü olan iNOS ile ilişkilendirilmiştir. Obez diyabetik farelerde iNOS'nin açlık durumundaki hiperglisemide ve karaciğer insülin direncinin artışında etkili olduğu rapor edilmiştir (Fujimoto ve ark 2005). Etkili bir vazodilatatör olan NO'nun diyabetik anjiyopati gelişiminde rol aldığıda düşünülmektedir (Liu ve ark 2008). Diyabetik farelerde iNOS yokluğunda iskemi-reperfüzyon sırasındaki miyokard hasarının azaldığı rapor edilmiştir (Marfella ve ark 2004). Diabetes mellitus'da iNOS miktarındaki değişimlere bağlı olarak kardiyovasküler dokuların çeşitli uyaranlara verdiği cevapta farklılıklar olabileceği belirtilmektedir (Cheng ve ark 2004, Soliman ve ark 2008). Diğer taraftan diyabetik retinopatisi olan ve olmayan hastaların serumlarında NO seviyesi bakımından fark bulunmadığı rapor edilmiştir (Abdel Hamid ve ark 2009).

Diyabet oluşturulmuş sıçanlardaki iNOS salgılanmasındaki artış endotelyal disfonksiyon oluşumu ile ilişkili bulunmuştur (Nagareddy ve ark 2005). Endotelyal disfonksiyon ise kardiyovasküler hastalıklar, hipertansiyon, dislipidemi oluşumunda rol oynar ve bu durumlarda diyabetik nefropati oluşumuyla ilişkilendirilmiştir (Rippin ve ark 2003, Zimmerman ve Flores 2009).

1.6.7. Diyabet ve Apoptozis

Diabetes mellitusun patogenezinde pankreastaki insülin salgılayan β hücrelerinin apoptozisinin rol aldığı rapor edilmiştir (Donath ve ark 1999, Leonardi ve ark 2003, Hayashi ve Faustman 2003, Sia ve Hänninen 2006). Pankreatik ada hücrelerindeki apoptozisden IFNγ/TNFα gibi sitokinlerin sinerjistik etkilerinin sorumlu olabileceği rapor edilmiş ve bu durumun otoimmun diyabet oluşumunda etkili olabileceği belirtilmiştir (Lee 2002). İnterlökin-1β, IFN-γ ve TNF α'nın pankreastaki hücre hasarı ve apoptozisi mekanizması üzerine etkili olduğu belirtilmiştir (Friedlander ve ark 1996, Graves ve ark 2001, Alexandraki ve ark 2006). Tip 1 diyabet oluşumunda apoptozis mekanizmasında en etkili kaspaz olan kaspaz-3'ün etkili olarak β hücrelerindeki apoptozis oluşumunu uyardığı belirtilmektedir (Cai ve ark 2002, Liadis ve ark 2005). Ayrıca diyabetik hastalarda apoptozis mekanizmasının merkezindeki Fas-FasL etkileşiminin etkili olduğu ve Fas-FasL etkileşiminin baskılanmasının diyabetik retinopatinin tedavisine fayda sağlayabileceği belirtilmiştir (Joussen ve ark 2009). İleri glikozilasyon son ürünleri,

ROT, MAPK ve proapoptotik transkripsiyon faktörü “proapoptotic transcription factor” yolunu kullanarak fibroblastlarda apoptotik hücre ölümünde artışa neden olurlar. “Serine/threonine kinaz” ailesine üyesi olan birçok MAPK’ler vardır ve özellikle, JNK, p38 gibi çeşitli MAPK’lar apoptozis oluşumuna katılırlar. Hiperozmotik stres, TNF, IL-1, iyonizasyon, ultraviyole ışınlar, kemoteropatik ilaçlar gibi çeşitli stres sinyalleriyle aktive olan MAPK’ların FOXO1 ve kaspaz-3’ü uyardığı ve sonuçta apoptozisin arttığı belirtilmiştir (Alikhani ve ark 2007, Li ve ark 2007).

Kontrolsüz diyabette hipergliseminin apoptozisi doğrudan ya da dolaylı olarak etkilediği, çeşitli organlarda apoptozisi uyarırken bazı durumlarda ise baskıladığı saptanmıştır (Guo ve ark 2004, Hall ve ark 2000). Lenfositler, kalp ve osteoblastik hücrelerde diyabete bağlı apoptotik hücre ölümünün arttığı rapor edilmiştir (He ve ark 2004, Otton ve ark 2004, Ghosh ve ark 2005). Akut hipergliseminin sıçanların kalp hücrelerindeki iNOS, NO ve süperoksit miktarını düzeyinin arttırdığı, peroksinitrit üretimiyle birlikte yüksek glukoza bağlı toksik etkilerin görüldüğü ve nitrotrozin oluşumuyla birlikte apoptotik hücre ölümünün gerçekleştiği rapor edilmiştir (Ceriello ve ark 2002). Diyabetik nöropatide de, apoptozisin arttığı ve bu problemin patofizyolojisinde apoptozisin rol oynayabileceği belirtilmiştir (Srinivasan ve ark 2000, Guo ve ark 2004). Ayrıca kültüre edilmiş insan Langerhans adacıklarında yüksek seviyeli glikozun apoptozise sebep olduğu belirlenmiştir (Federici ve ark 2001). Diyabette çeşitli hücrelerdeki apoptozis artışına zıt olarak, hipergliseminin vasküler düz kas hücrelerindeki apoptozisi protein kinaz C bağımlı yol aracılığı ile baskıladığı rapor edilmiştir (Hall ve ark 2000). Ayrıca, yüksek glikoz durumunun, koroner arter düz kas hücrelerinde bcl-xL ve bfl-1/A1 düzeylerini arttırarak apoptozisi baskıladığı saptanmıştır (Sakuma ve ark 2002). Diyabetik sıçanlardaki hepotomegalide, azalmış apoptozisin rol oynadığı rapor edilmiştir (Herrman ve ark 1999).

1.6.8. Diyabet ve Periodontitis

Diyabetin periodontitis gibi bakteriyel infeksiyonlar için yüksek risk grubu olduğu bilinmekte ve periodontitis ile diyabet arasındaki ilişki uzun yıllardan beri birçok araştırma için konu oluşturmaktadır. Hatta periodontal hastalıklar diyabetin

komplikasyonu olarak kabul edilmiştir (Nishimura ve ark 1998, Iacopino 2001, Borrell ve ark 2005, Campus ve ark 2005).

Diyabet ve periodontal hastalık arasında güçlü bir çift yönlü ilişki olduğunu belirten birçok çalışma mevcuttur (Mealey 2006, Lalla 2007, Carpenter 2010). Metabolik bozukluklar, insülin direnci ve periodontitis arasında güçlü bir ilişki olduğu rapor edilmiştir (Benguigui ve ark 2010). Hem DM'nin hem de periodontal hastalıkların multifaktöriyel hastalıklar olması, patogenezlerinin benzerlik göstermesi, immunolojik ve genetik bazı ortak noktalarının olması, hastalıklardan birinin tedavisi ile diğerinde düzelme sağlandığının görülmesi bu iki hastalığın tedavisinin kombine olarak yapılması gerekliliğini ortaya çıkarmıştır (Al-Mubarak ve ark 2002, Tsai ve ark 2002, Campus ve ark 2005). Periodontal tedavinin olumsuz diyabet tablosunu iyileştirdiği HbA1c seviyesini düşürdüğü (Iwamoto ve ark 2001, Kıran ve ark 2005, O'Connell ve ark 2008, Correa ve ark 2010) aynı şekilde diyabetin kontrol altında olmasının periodontal dokular üzerinde olumlu etkilerinin olduğu birçok çalışmada rapor edilmiştir (Christgau ve ark 1998, Stewart ve ark 2001, Taylor 2001, Taylor 2003, Mealey ve Oates 2006). Bununla birlikte periodontal problemin tedavi edilmesi ve diyabet arasında ilişki bulunamayan çalışmalarda rapor edilmiştir (Syrjälä ve ark 2003, Correa ve ark 2008, Cruz ve ark 2008, Tervonen ve ark 2009).

Kontrol altındaki diyabet hastalarının periodontal terapiye verdikleri yanıtın sağlıklı bireylerinkiyle benzer olduğu saptanmıştır (Christgau ve ark 1998). Kontrolsüz Tip 1 diyabetiklerde (Tervonen ve ark 2000) ve zayıf kontrollü Tip 2 diyabetlilerin ileri seviyede periodontal hastalığa yatkın olduğu (Tsai ve ark 2002, Campus ve ark 2005), ve sigaranın bu yıkımı arttırdığı (Syrjälä ve ark 2003) tespit edilmiştir Diyabeti olan ve periodontitisli bireylerin ilgili bölgedeki *Capnocytophaga spp.* gibi mikroorganizmaların sayısı diyabeti olmayan periodontitisli bireylerden daha fazla bulunmuştur (Ciantar ve ark 2005). Prediyabetik sıçanlarda böbrek hipertrofisi ve artmış glomeruler hacim ile periodontitis arasında ilişki saptanmış ve periodontitisin erken dönem böbrek değişikliklerinde etkili olabileceği rapor edilmiştir (Andersen ve ark 2008).

Diyabetik bireylerin glisemik durumlarının periodontal sondlama derinliğini, tükrük pH'sını, tamponlama kapasitesini ve peroksidaz aktivitesini etkilediği rapor

edilmiştir (Aren ve ark 2003). Diyabet ve periodontal hastalığı olan sıçanların sadece diyabeti olan sıçanlara göre glikoz intoleransının %30 arttığı ve adipoz dokuda %25 daha fazla IL-1β seviyesine sahip olduğu rapor edilmiştir. Periodontal hastalığı olan diyabetik sıçanlardaki alveoler kemik kaybının, diyabeti olmayan ancak periodontal hastalığı olan sıçanlardan daha fazla olduğu belirlenmiştir. Periodontal hastalığın diyabetin metabolik kontrolünü kötüleştirdiği ve diyabetin seyrinde oldukça etkili olduğu düşünülmektedir (Andersen ve ark 2006).

Tip 1 ve tip 2 diyabetik bireylerde cerrahisiz periodontal tedavi ve günde iki kez subgingival su irrigasyonu sonucunda; modifiye gingival indeks, sondlamada kanama ve plak indeksinde azalma gözlenmiştir. Ayrıca, periodontal tedavi sonrası sistemik olarak kanda ROT oluşumunda azalma gözlenmiştir (Al-Mubarak ve ark 2002).

Diyabet, Periodontitis ve Sitokin

Periodontitis ve diyabet birçok yönden benzerlik gösteren, oluşumlarında çeşitli faktörlerin rol oynadığı hastalıklardır ve bu hastalıkların oluşumu, gelişimi ve tedavisiyle birlikte pro-enflamatuvar ve anti-enflamatuvar sitokin düzeylerinde değişiklikler meydana gelebilmektedir (Engebretson ve ark 2004, King 2008, Salvi ve ark 2010). Kronik periodontitisli ve diyabetik hastalarda DOS'daki IL-4, IL-17, IL-23, TNF-α, IFN-γ seviyeleri kontrollü ve kontrolsüz diyabetik hastalarda değerlendirilmiştir. Sonuçta IL-17 seviyesi kontrolsüz diyabetiklerde daha yüksek bulunmuştur. İnterferon-γ kontrollü diyabetiklerde daha yüksek bulunmuştur. İnterlökin-4 kontrollü diyabetiklerde daha düşük bulunmuştur. İnterlökin-23 ve TNF-α seviyeleri arasında fark bulunamadığı rapor edilmiştir (Santos ve ark 2010). Kronik periodontitisli ve diyabetik hastalarda periodontal tedavi sonucunda DOS IL-6 düzeyinin düştüğü, ancak IL-18 seviyesinin değişmediği rapor edilmiştir (Correa ve ark 2008). Kronik periodontitis teşhisi konulmuş diyabetik hastalarda DOS IL-1β seviyesi ve HbA1c arasında doğrusal bir ilişki olduğu rapor edilmiştir. Hipergliseminin, artmış enflamatuvar cevapta payı olduğu bununla bereber kontrolsüz diyabet ve periodontal yıkım arasında güçlü bir ilişki olduğu ileri sürülmektedir (Engebretson ve ark 2004).

Kronik periodontitise bağlı doku yıkımı olan ve DM teşhisi konulmuş hastalarda periodontal tedavi sonrası serum IL-6, IL-12 (p70) ve HbA1c seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma sağlanmış, ancak serum IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, TNF-α, IFN-γ seviyelerinde istatistiksel olarak önemli bir fark bulunamadığı rapor edilmiştir (O'Connell ve ark 2008). Ancak, diyabetik hastalardaki serum TNF-α ve HbA1c düzeylerinin periodontal terapiyle birlikte azaldığı ve periodontal terapinin metabolik kontrol ve insülin direnci üzerinde olumlu etkisinin olduğu rapor edilmiştir (Iwamoto ve ark 2001). Kronik periodontitisli ve diyabetik hastalarda periodontal tedavi sonrası 3. ayda plazma IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 seviyelerinde önemli bir değişim saptanamamıştır, ancak TNF-α düzeyinde azalma olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, tedavi öncesi HbA1c seviyesi tedavi sonrası değerlere göre daha yüksek düzeyde tespit edilmiştir (Correa ve ark 2010).

Diyabet, Periodontitis ve iNOS Ekspresyonu

Diyabet ve periodontitis durumunda dişeti enflamasyonu ve iNOS ekspresyonu arasında doğrusal bir ilişki olduğu rapor edilmiştir (Pan ve ark 2010). Tüm periodontal parametreler periodontitis grubunda kontrol ve diyabet grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. İmmunohistokimyasal parametrelerin tümü diyabet ve periodontitis grubunda sadece periodontitis veya sadece diyabet grubuna göre daha yüksek saptanmıştır. Diyabet ve periodontitis dışındaki tüm gruplarda iNOS ekspresyonu ve enflamatuvar hücreler arasında bir korelasyon olduğu rapor edilmiştir. Diyabet ve periodontitisin, enflamasyon ve İNOS ekspresyonu üzerinde sinerjistik bir etkileşimi olabileceği belirtilmiştir. Ancak bu olası sinerjistik etkinin sadece periodontitis olan gruba oranla daha fazla periodontal doku yıkımına sebep olmadığı rapor edilmiştir (Pan ve ark 2010).

Diyabet, Periodontitis ve Apoptozis

Diyabetin tek başına gingival dokulardaki apoptozisi baskıladığı, ancak deneysel diyabetle birlikte oluşturulan deneysel periodontitiste bağdoku ve dişeti epitelinde apoptozisin arttığı rapor edilmiştir. Diyabette apoptotik hücre ölümü açısından oluşan farklılıkların, hücrelerin cinsine ve hastalığın diğer patolojik durumlarla olan etkileşimlerine göre değişiklik gösterebileceği belirtilmiştir.

Diyabetin periodontal dokulardaki doku kalitesini etkileyerek periodontitisteki doku yıkımını arttırabileceği belirtilmiştir (Tunalı 2005).

1.6.9. Diyabet Tedavisi

Pankreasın insülin üretimini arttırmak ve insülin direncini azaltmak için çeşitli antidiyabetik ilaçlar ve yardımcı olarak vitaminler (E vitamini vb.) kullanılmakla birlikte insülin üretiminin çok azaldığı durumlarda glisemik durumu kontrol altında tutabilmek için insülin tedavisine ihtiyaç duyulabilir. Tip 1 diyabetik hastalar ömür boyu insülin tedavisi altında hayatlarını idame ettirirler (Vinik ve Vinik 2003, Mealey ve Ocampo 2007).

Diyabetin kontrolü için kullanılan ilaçlar ve kullanım amaçları aşağıda verilmiştir:

- *Sulfonylureas, Glyburide, Glipizide, Glimepiride:* Pankreastan insülin salgılanmasını uyarırlar.

- *Meglitinides, Repaglinide, Nateglinide:* Glikoz varlığında pankreastan hızlı insülin salgılanmasını uyarırlar.

- *Biguanides metformin:* Karaciğerden glikoz üretimini durdurur ve dokuların insülin duyarlılığını arttırır.

- *Thiazolidinediones, Rosiglitazone, Pioglitazone:* Dokuların insülin duyarlılığını arttırır.

- *α-Glucosidase inhibitors, Acarbose, Miglitol*: Karbonhidratların sindirim sisteminden yavaş emilimiyle yemek sonrası glisemik pik seviyesini düşürürler.

Farklı sınıf ilaçların etkilerinden aynı anda yararlanabilmek için kombine ajanlar üretilmiştir: 1) Metformin ile kombine glyburide 2) Metformin ile kombine glipizide 3) Metformin ile kombine rosiglitazone. Diyabet tedavisinde insulin lispro, insulin aspart, regular, NPH, ultralente, glargine gibi çeşitli insülin tipleri kullanılmaktadır (Mealey ve Ocampo 2007).

1.6.10. Diyabet ve Antioksidanlar

Streptozotosin ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda melatonin (100 μg/kg) ve E vitamini (100 mg/kg) uygulamasının, diyabetle birlikte artmış; plazma total kolestrol, trigliserid, düşük yoğunluklu lipoprotein "low density lipoprotein" (LDL) değerlerini düşürdüğü belirtilmiştir. Melatonin'in oksidatif stresi azaltarak, organizmayı diyabetik komplikasyonlardan, oksidatif hasar ve dislipidemiden koruduğu belirtilmiştir. Diyabetik olgularda melatonin'in düşük dozlarda bile özellikle böbrek ve beyinde etkili bir antioksidan olduğu rapor edilmiştir (Baydas ve ark 2002).

Antioksidan etkisi olan üzüm çekirdeğinin diyabetik sıçanlarda ağızdan 100 mg/kg/gün kullanımının plazma ve karaciğer dokularında antioksidan aktiviteyi iyileştirdiği ve lipidperoksidaz ve karbonlanmış protein seviyesini düşürdüğü belirtilmiştir. Üzüm çekirdeği ekstresinin, hiperglisemik durumda artan ROT'lara karşı antioksidan savunmasını arttırdığı ve bu sayede karaciğer hücrelerini koruyabiliceği belirtilmiştir (Chis ve ark 2009).

Tip 2 diyabetli bireylerde günlük 500ml domates suyu içilmesiyle plazma 'lycopene' likopen seviyesinin arttığı ve günde 800 U E vitamini alımıyla, kalp krizi geçirilmesinde bir risk faktörü olan plazma CRP seviyesinin azaldığı rapor edilmiştir. Diyabetik bireylerdeki kalp krizi geçirme riskinin azaltılmasında E vitamininin etkili olabileceği belirtilmiştir (Upritchard ve ark 2000).

Diyabetik sıçanlarda insülin ve A vitamininin kombine kullanımının sıçan kalbinde oluşan peroksidatif hasarı baskılamakta bu ajanların ayrı ayrı kullanımından daha fazla fayda sağlayabileceği belirtilmiştir (Zobalı ve ark 2002). Kontrollü diyabetiklerin kandaki vitamin A,B,C,E seviyelerinin kontrolsüz diyabetiklere kıyasla daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Woo ve ark 2010).

Deneysel diyabetik hamilelikte kombine E ve C vitamini kullanımının, diyabetle artan reaktif ürünleri baskıladığı bununla birlikte fetal dokularda oluşabilecek malformasyon, oksidatif hasar ve oksidatif stresi azalttığı rapor edilmiştir ve antioksidan savunma mekanizmasını düzenlemek amacıyla E ve C vitamini gibi antioksidanlardan faydalanılabileceği belirtilmiştir (Cederberg ve ark 2001, Zaken ve ark 2001).

Tip 2 diyabet oluşturulmuş sıçanlarda C vitamini ve naringin uygulamasının, insülin uygulamasına benzer şekilde etki gösterdiği ve biyokimyasal parametreler üzerinde olumlu etkisinin olduğu rapor edilmiştir. Diyabetik sıçanlarda C vitamini ve naringin uygulamasının antihiperglisemik ve antioksidan etkilerinin olduğu belirtilmiştir (Punithavathi ve ark 2008).

Tip 1 ve Tip 2 diyabetik bireylerde endotelyuma bağımlı vazodilatasyonda meydana gelen bozulmanın C vitamini kullanımıyla iyileştirilebileceği bildirilmiştir ve C vitamini gibi antioksidanların vücuttaki biyokimyasal parametreleri olumlu yönde değiştirebileceği rapor edilmiştir (Ting ve ark 1996, Timimi ve ark 1998, Al Shamsi ve ark 2006). Tip 2 diyabetik bireylerde C vitamini kullanımının oksidatif stresi azalttığı ve C vitamini ve insülin kullanımının, insülinin diyabetik bireylerdeki damarsal faydalı etkilerini genişletebileceği ve oksidatif stres ve endotelyal fonksiyon üzerine olumlu etkileri olabileceği belirtilmiştir (Evans ve ark 2003). Diğer taraftan diyabetik kadınlarda ilave yüksek miktarda C vitamini alımının kalp damar hastalıkları riskini arttırabileceği rapor edilmiştir (Lee ve ark 2004).

Diyabet oluşturulmuş sıçanların çeşitli dokularında kontrol grubuna kıyasla daha yüksek oranda lipid hidroperoksit ve kontrol grubuna göre daha düşük oranda C vitamini olduğu rapor edilmiştir ve bu durumun diyabette artan oksidatif stresin bir kanıtı olabileceği belirtilmiştir (Sun ve ark 1999).

Obez olmayan farelerde, D vitamini eksikliğinin Tip 1 diyabet gelişme olasılığını arttırdığı rapor edilmiştir (Giulietti ve ark 2004). Diyabet oluşumu ve D vitamini alımının ilişkili olduğu, genetik olarak Tip 1 diyabet yatkınlığı olan çocuklarda D vitamini kullanımının diyabetten korunmada fayda sağlayabileceği belirtilmiştir (Hyppönen ve ark 2001, Giulietti ve ark 2004). D vitamini kullanımının Tip 2 diyabet gelişme riskini azaltabileceği rapor edilmiştir (Pittas ve ark 2006). Gestasyonel diyabeti ve bozulmuş glikoz toleransı olan hamile kadınlardaki D vitamini düzeyinin diyabeti olmayan kadınlardan daha düşük olduğu rapor edilmiştir (Soheilykhah ve ark 2010).

1.7. Antioksidanlar ve E Vitamini

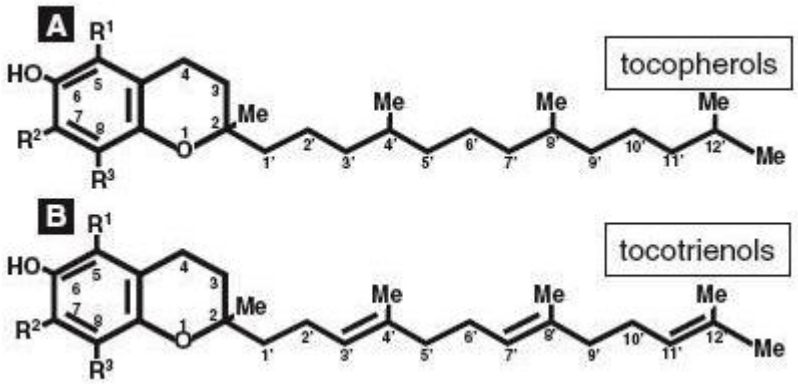
Antioksidan savunma sistemleri, dolaylı enzimatik antioksidan enzimler ve küçük molekülleri doğrudan toplayan serbest radikaller ve ilişkili molekül

“reaktan”lar şeklinde sınıflanabilir. Antioksidan enzimler toksik moleküllere karşı ilk savunma sistemini oluştururlar. Oksijenin indirgemesindeki ilk enzimatik reaksiyon süperoksit dismutazı içerir. Diğer enzimler hidrojen peroksiti ortamdan uzaklaştıran peroksidazlar ve katalazdır. En çok bulunan peroksidaz seleneyum bağımlı glutatyon peroksidazdır (Cutando ve ark 2007). Vitamin E ve C gibi dış kaynaklı antioksidanlar hücre membranında, hücre içinde ve hücreler arasında lokalize olabilirler. Bunlar ROT’leri baskılar ya da ortamdan uzaklaştırır (Rodrigo ve ark 2007). Transferin ve latoferrin serbest Fe^{2+}’i bağlayarak hidroksil radikali oluşumunu engeller. Seruloplazmin Fe^{2+}’nin Fe^{3+}’e oksidasyonunu katalizleyerek yine hidroksil radikal oluşumunu azaltır. Haptoglobin ve hemopeksin hücre dışı radikal üretimini dolaylı olarak engeller (Splettstoesser ve Schuff-Werner 2002).

William Fletcher 1905 yılında özel faktörlerin (vitaminler) besinlerden çıkarıldığında hastalığın meydana geldiğini saptamıştır. Fletcher, temizlenmemiş pirinç tüketiminin Beriberi hastalığını engellerken, temizlenmiş pirinç tüketiminin engellemediğini bulduğunda, Beriberi hastalığının nedenlerini araştırmaktaydı. Fletcher pirincin kabuğunda özel besin maddeleri bulunduğuna inanmaktaydı. Sonraki yıl İngiliz biyokimyacı Sör Frederick Gowland Hopkins bazı besin faktörlerinin sağlık için önemli olduğunu keşfetti. 1912’de Polonyalı bilim adamı Cashmir Funk, yiyeceklerin bu özel besleyici kısmına hayat anlamına gelen ‘vita’ ve pirinç kabuklarından izole ettiği “thiamine” içinde bulunan bileşiklerden elde edilen “amine” kelimelerinden oluşan ‘vitamine’ adını verdi. “Vitamine” ismi, vitaminlerin hepsinin nitrojen içermemesi ve böylece hepsinin “amine” olmadığı bulunduktan sonra vitamin olarak kısaltıldı. Hopkins ve Funk vitamin eksikliği hastalıklarını belirtirken, vitamin azlığında insanların hasta olabileceğini belirtmişlerdir. Vitamin E, 1922’ de Kaliforniya Üniversitesi araştırıcıları Herbert Evans ve Katherine Bishop tarafından yeşil yapraklı sebzelerde bulunmuştur. 1924’ te vitamin E ismi konmuştur. Çünkü vitamin E üremeyi desteklemektedir ve bilimsel ismi tokoferoldür. Bu kelime ise Yunanca çocuk doğumu anlamına gelen “tokos”, geleceği getiren “phero” ve alkol özelliği olduğu belirtmek için “ol” eklenerek oluşturulmuştur. Araştırmalar sonucunda 1936 yılında vitamin E’nin buğday tohumu yağında bolca bulunduğu keşfedilmiştir. İki yıl sonra ilk kez kimyasal olarak sentez edilmiştir. Birleşik Devletler Ulusal Araştırma Konseyi vitamin E’nin esansiyel bir vitamin olduğuna dayanarak, vitamin E eksikliği çalışmalarına destek olmuştur. Vitamin E insan

vücudunda bir antioksidan gibi fonksiyon gören yağda çözünen esansiyel bir vitamindir. Esansiyel olmasının nedeni vücut tarafından üretilememesidir. Ancak, yemeklerle ve diğer desteklerle alınır. 1938'de Fenholz tarafından vitamin E'nin kimyasal yapısı açıklandıktan ve aynı yıl Karrer tarafından dl-α-tokoferol sentezi gerçekleştirildikten sonra dikkatler vitamin E olarak nitelendirilecek doğal bileşiklerin kimyasal sınıfı üzerine yoğunlaştırıldı. Günümüzde vitamin E, tüm tokoferoller ve onların RRR-α-tokoferolün biyolojik aktivitesine sahip, vitamin E aktivitesi ile stereo-izomer bileşikler oluşturan türevlerini anlatan jenerik bir terimi temsil eder. Doğada vitamin E aktivitesine sahip sekiz madde bulunmuştur. Bunlar: "α-","β-","γ-" ve "δ-" "tokoferol" ve "α-", "β-", "γ-" ve "δ-" "tokotrienol"dür (Sen ve ark 2006).

E vitamini terimi yapısal olarak farklı sekiz molekülü tanımlamaktadır. Dört tokoferol grubu (α, β, δ, γ) "chromanol" halkasının 5, 7 ve 8 uçlarındaki farklı metil gruplarından ve 16 karbonluk doymuş bir zincirden meydana gelmektedir (Schneider 2005, Rodrigo ve ark 2007).



Resim1.5. Tokoferol ve tokotrienollerin kimyasal yapısı (Sen ve ark 2006).

Tokotrienoller "chromanol" halkasında tokoferollerle aynı özelliğe sahipken 16 karbonluk doymamış zincirin 3', 7' ve 11' pozisyonlarında üç tane çift bağ bulunmaktadır (Resim 1.5). Bu moleküllerin hepsi antioksidan özelliğine sahiptir ancak α-tokoferol kimyasal ve biyolojik olarak en etkili olandır. Genellikle E vitamini α-tokoferolle eş anlamlı olarak kullanılır, ancak E vitamininin sekiz doğal formundan sadece biridir (Schneider 2005, Rodrigo ve ark 2007).

RRR–α-tokoferol'ün yarılanma süresi yaklaşık 48 saattir. Alfa-tokoferol suda çözünmez, yağ, aseton, etanol, eter ve diğer organik çözücülerde çözünür (Schneider 2005). Yağ asidinin kendiliğinden oksidasyonu radikal reaksiyonlarının sonucunda meydana gelir. Önce yağ asiti radikali oluşur ve hızla oksijenle reaksiyona girer. Sonuçta oluşan peroksil radikali başka bir yağ asitine hidroperoksit vererek ondan hidrojeni ayırır ve yeni yağ asidi radikali oluşur. Antioksidanlar bu süreci kesme kapasitesine sahiptir (Schneider 2005).

Vitamin E ve C gibi dışsal antioksidanlar hücre membranında, hücre içi ve dışında lokalize olabilirler. Bunlar ROT'leri ya baskılarlar ya da ortadan kaldırırlar. Yağda çözünen bir vitamin olan E vitamini membran bütünlüğünü korumakla görevli en önemli antioksidandır (Rodrigo ve ark 2007).

Alfa-tokoferol'ün anti-enflamatuvar etkileri:

- Etkin doz >600-800 IU RRR-α-tokoferol

- Etkisi 1-3 aylık bir süreç

-Plazma CRP düzeylerinde azalma

-Tip 2 diyabetiklerden salınan IL-1β, IL-6, TNF-α gibi sitokinlerde azalma

-Lipopolisakkarit ile aktive olmuş periferal kan mononükleer hücrelerden salınan IL-1β ve TNF-α düzeylerinde azalma

-Tip2 diyabette adezyon molekülü ve plazminojen aktivatör inhibitör-1 düzeylerinde azalma (Singh ve Jialal 2004).

Vitamin E fagositik enflamatuvar hücrelerden salınan serbest oksijen radikallerini baskılayabilme özelliğindedir (Asman ve ark 1994). Alfa-tokoferol antioksidan reaksiyonlarında oksijenle reaksiyona girmez. Antioksidan reaksiyonlarının temelinde oksijenin uzaklaştırılması değil yağ asitleri tarafından sürdürülen radikal zincirin kendiliğinden oksidasyonunun durdurulması vardır. Alfa-tokoferol lipid peroksidasyonunun birincil üretimi olan yağ asiti peroksil radikalleriyle reaksiyona girer ve zincir reaksiyonunu durdurur. Ayrıca, peroksil radikalleriyle başka reaksiyonlara girdiğinden daha hızlı reaksiyona girmesi, okside

yağ asitinden radikal karakterindeki yapıları uzaklaştırıp daha fazla radikal reaksiyonunu engellemesi, antioksidan reaksiyonda oldukça stabil bir radikale dönüşmesi gibi özellikleri de önemlidir (Schneider 2005). E vitaminin farelerde sistemik enflamasyonu azaltıcı etkilerinin olduğu da rapor edilmiştir (Shingu ve ark 2010).

Alfa-tokoferol'ün antioksidan fonksiyonları mevcuttur ve biyolojik lipid fazların ana peroksil radikali toplayıcısıdır. Kendisi okside olup α-tokoferoksile dönüşerek lipid peroksidasyonunu baskılar. Alfa-tokoferol, C vitamini, "ubiquinol" gibi redoks aktif moleküllerle "α-tokoferoksil" radikalinden indirgenerek eski haline gelebilir (Rodrigo ve ark 2007)**.** Oksidatif stres aterosklerozun gelişmesinde de önemli rol oynar. Oksidatif stresle ilişkili yıkıcı olaylar ya doğrudan ya da proteinlerin ve DNA'nın modifikasyonu, gen ekspresyonunda değişiklik, enflamasyonun artışı ve damar duvarında endotelyal fonksiyon bozukluğu gibi aterosklerotik durumda yer alan olayların şiddetlenmesiyle dolaylı olarak etki eder (Rodrigo ve ark 2007). E vitamininin serbest radikallerle uyarılan eritrosit şekil değişikliğinin önlenmesinde de etkili olabileceği rapor edilmiştir (Begum ve Terao 2002).

E vitamini ateroskleroz ve kanser oluşumunu ve nöron hasarını baskılayıcı özelliği olduğu düşünülmektedir (Mo ve Elson 1999, Nesaretnam ve ark 2000, Khanna ve ark 2003, Osakada ve ark 2004, Schneider 2005). Ayrıca, E vitamini kullanımının iskemik kalp hastalığı ve romatoid artirit gibi hastalıkların insidansını azalttığı da rapor edilmiştir (Gey ve ark 1991, Canter ve ark 2007). Vitamin E'nin, kemik kalsifikasyonunun normal bir şekilde sürdürülebilmesinde etkili olduğu belirtilmiştir (Norazlina ve ark 2002).

Diyetteki temel E vitamini kaynakları meyveler, sebzeler, çekirdek ve çekirdek yağlarıdır. Ayçiçeği çekirdeği, zeytinyağı ve badem zengin α-tokoferol kaynaklarıdır (Schneider 2005). E vitamininin yara iyileşmesini hızlandırdığı, iNOS üretimini baskıladığı ve oksidatif hasara karşı koruma sağladığı çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir (Kim ve Shklar 1983, Ayasolla ve ark 2004, Calvisi ve ark 2004, Sadir ve ark 2007).

Preneoplastik ve neoplastik fare meme epitelyal hücrelerinde ve tokotrienollerin (E vitamini) anti-proliferatif ve apoptotik etkileri olduğu rapor edilmiştir (Mcintyre ve ark 2000). Hidroksil radikalleri, hidrojen peroksitler ve tek "singlet" oksijen apoptotik hücre ölümünü arttırırlar. Alfa tokoferol, N-asetil-sistein gibi dışsal antioksidanlar bu moleküllerin proapoptotoik özelliklerini önlerler (Splettstoesser ve Schuff-Werner 2002). Birçok çalışmada tümöral oluşumlar ve benzeri durumlarda E vitaminin apoptozis üzerinde uyarıcı bir etkisi olduğu rapor edilmiştir (Zhang ve ark 1997, Birringer ve ark 2003, Shah ve ark 2003, Gu ve ark 2008, Kanai ve ark 2010).

1.7.1. Diyabet Tedavisinde Yardımcı Olarak E Vitamini Kullanımı

Kandaki düşük E vitamini düzeyinin Tip 2 diyabet gelişme riskini arttırdığı, diyabet riski olan bireylerde destekleyici Vitamin E kullanımının bu riski azalttığı ve eğer diyabet gelişmişse de vitamin ilavesinin nefropati, anjiopati, nöropati ve embriyopati gibi komplikasyonları en az düzeye indirebileceği ileri sürülmektedir (Halliwell 2002, Montonen ve ark 2004, Saldeen ve Saldeen 2005). Streptozotosin ile diyabet oluşturulmuş, E vitamininden zengin diyetle beslenen sıçanlarda AGE miktarının azaldığı ve glisemik kontrolün iyileştiği rapor edilmiştir (Wan Nazaimoon ve Khalid 2002). Ağızdan dört ay boyunca E vitamini (1800 IU/gün) kullanımının retinopati ve nefropati gibi diyabetik komplikasyonların gelişmesi riskini azaltabileceği belirtilmiştir. Ağızdan E vitamini kullanımının retinal kan akışını arttırarak retinal hemodinamik anormallikleri düzelttiği ve kreatinin klirensini düzenleyerek böbrek fonksiyonlarını iyileştirdiği rapor edilmiştir (Bursell ve ark 1999). Kan glikoz seviyesinin diyabetik sıçanlarda arttığı ancak E vitamini uygulamasıyla birlikte kan glikoz düzeyinin azaldığı rapor edilmiştir. Ayrıca E vitamininin böbreklerdeki kalsiyum seviyesini ve lipid peroksidasyonunu düşürdüğü ve böbreklerdeki bozulmuş kalsiyum metabolizmasını düzenlediği rapor edilmiştir. Diyabetik bireylerde E vitamini uygulamasının hücresel hasar ve nefropati oluşumunu baskılayabileceği belirtilmiştir (Pekiner ve ark 2003). Diyabetik bireylerde 14 gün boyunca 600 mg E vitamini uygulamasıyla üriner 8-Iso-Prostaglandin F2α ve 11-dehidro-tromboksan B2 düzeylerinde azalma sağlanmış ve bu düzeylerde azalma sağlanan bireylerde metabolik kontrolde iyileşme olduğu belirtilmiştir (Davi ve ark 1999). Tip 1 diyabetli hastalarda E vitamini kullanımının

endotelyal fonksiyonları iyileştirdiği rapor edilmiştir (Skyrme-Jones ve ark 2000). Diğer taraftan Tip 2 diyabetli bireylerde ağızdan günlük 1600 IU α-tokoferol alan bireylerle almayanlar karşılaştırılmış ve α-tokoferol'ün damar endotelyal fonksiyonu üzerine olumlu bir etkisinin olmadığı rapor edilmiştir (Gazis ve ark 1999). E vitamininin embriyodaki mitokondrial disfonksiyonu baskılayarak malformasyonların oranını düşürdüğü saptanmış ayrıca E vitamininin embriyoların boyutlarını ve gelişimlerini arttırabileceği rapor edilmiştir (Viana ve ark 1996, Yang ve ark 1998, Viana ve ark 2003).

Araştırmalarda diyabet tedavisinde yardımcı E vitamini uygulamasının oksidatif stresi baskıladığı ve doku yıkımının önlenmesinde etkili olabileceği saptanmıştır (Manning ve ark 2004, Seven ve ark 2004). Tip 2 diyabetik bireylerde günlük 900 mg E vitamini kullanımının insülin aktivitesini iyileştirdiği ve oksidatif stresi azalttığı rapor edilmiştir (Paolisso ve ark 1993). Gama tokoferol insülin salgılayan hücrelerin fonksiyonlarının nitrik oksit tarafından baskılanmasını kısmen engellemektedir (Sjöholm ve ark 2000). Kontrollü diyabetiklerde, kontrolsüz diyabetiklere göre tiyobarbiturik asit reaktif ürünleri "thiobarbituric acid-reactive substances" düzeyinin azaldığı, glutatyon ve E vitamini seviyesinin arttığı ve bu duruma bağlı olarak oksidatif stresin azaldığı ve ilave olarak günlük 400 mg E vitamini kullanımının bu durumu daha fazla iyileştirdiği rapor edilmiştir (Sharma ve ark 2000). Vitamin E'nin oksidatif stres ve karaciğer hücre fonksiyonları üzerinde olumlu bir etkisinin olduğu, geçici olarak insülin direncini iyileştirdiği (Manning ve ark 2004) ve E vitamini takviyesinin, HbA1c düzeyini düşürdüğü, ROT'nin etkilerine bağlı gelişen pankreasın β hücrelerindeki hasarı azaltarak glisemik kontrolü iyileştirdiği rapor edilmiştir (Jain ve ark 2000, Ihara ve ark 2000). Diğer taraftan Tip 1 diyabet olgularında E vitamini kullanımının HbA1c seviyesini değiştirmediği rapor edilmiştir (Bursell ve ark 1999, Skyrme-Jones ve ark 2000). Tip 1 diyabetiklerde E vitamini uygulamasının eritrositlerde glutatyon konsantrasyonunu arttırdığı ve lipid peroksidasyonu ve HbA1c konsantrasyonunu düşürdüğü rapor edilmiştir (Jain ve ark 2000). Tip 2 diyabetli bireylerde günlük 800 IU E vitamini kullanımıyla açlık glikoz, fruktozamin, kolestrol, trigliserid, LDL düzeylerinin düştüğü buna ilave olarak β hücre fonksiyonlarının düzeldiği ve insülin seviyesinin arttığı rapor edilmiştir. Ayrıca, E vitamini seviyesinin artışıyla oksidatif stresin baskılandığı ve diyabetin kontrol altına alınabileceği saptanmıştır (Gökkuşu ve ark

2001). Diğer taraftan sekiz hafta boyunca günde 400 U E vitamini alan bireylerde DNA oksidatif hasarı ve plazma LDL seviyeleri bakımından önemli fayda sağlanamadığı belirtilmiştir (Astley ve ark 1999). Diyabette E vitamini kullanımının oksidatif stres ve diyabetik komplikasyonlarla ilişkili yağ asidi metobolizmasının düzenlenmesinde etkili olabileceği belirtilmiştir (Çelik ve ark 2002, Seven ve ark 2004). Ancak, Tip 2 diyabetli bireylerde günde 300 mg E vitamini kullanımının kalp-damar sistemi üzerinde olumlu bir etkisinin olmadığı rapor edilmiştir (Sacco ve ark 2003). Ayrıca, günlük 600 IU E vitamini alımının kadınlarda Tip 2 diyabet oluşumunun engellenmesinde anlamlı bir etki sağlamadığı gösterilmiştir (Liu ve ark 2006).

1.7.2. Periodontitis ve Antioksidanlar

Oksidatif stres ve periodontitis arasında güçlü bir ilişkili vardır ve periodontal dokularda oksidatif hasarla birlikte meydana gelebilecek olumsuzlukların önüne geçmek için çeşitli antioksidanların kullanımı gündeme gelmiştir (Asman ve ark 1994, Nishida ve ark 2000, Neiva ve ark 2005, Di Paola ve ark 2005, Tomofuji ve ark 2009). Düşük doz plazma C vitamini seviyesi ve periodontitis arasında ilişki olduğu belirtilmiş ve C vitamini konsantrasyonunun düşük olmasıyla *P. gingivalis* antikorları arasında negatif bir ilişki olduğu rapor edilmiştir (Pussinen ve ark 2003). Diğer taraftan periodontal tedaviye ek olarak C vitamini kullanımının periodontal dukular üzerinde ilave bir fayda sağlamadığı saptanmıştır (Abou Sulaiman ve Shehadeh 2010). Flep cerrahisine ek olarak B vitamini kompleksi kullanımının kontrol grubuna göre daha iyi klinik ataşman kazancı sağladığı belirtilmiştir (Neiva ve ark 2005). Periodontitis ve konjestif kalp yetmezliği arasında ilişki bulunmuştur ve "lycopene" kaynağı olan domatesin yüksek miktarda tüketilmesinin periodontitis hastalarında konjestif kalp yetmezliği riskini azalttığı belirtilmiştir (Wood ve Johnson 2004). İçeriğindeki flavonoid'den ötürü antioksidan özelliği olan kakaodan zengin diyetle beslenen deneysel periodontitis oluşturulmuş sıçanlarda, kakao kullanımıyla alveoler kemik kaybı ve polimorfonükler lökosit infiltrasyonunun azaldığı rapor edilmiştir. Kakao kullanımının periodontitis gelişimini ve periodontitise bağlı oluşan oksidatif stresi baskılayabileceği belirtilmiştir (Tomofuji ve ark 2009). Köpeklerde diş çekimi sonrası artan oksidatif stresin, çekim soketine melatonin uygulaması ile baskılandığı rapor edilmiştir (Cutando ve ark 2007). Bir

antioksidan olan pirolidin ditiokarbomat 'pyrrolidine Dithiocarbamate' uygulamasıyla deneysel periodontitis oluşturulmuş sıçanların dişeti dokularında TNF-α ve iNOS düzeylerinin düştüğü ve deneysel periodontitis oluşumuna bağlı doku hasarının iyileştiği belirtilmiştir (Muià ve ark 2006). Reaktif oksijen türlerini baskılayıcı özelliği olan Tempol kullanımı ile deneysel periodontitis oluşturulmuş sıçanlardaki enflamatuvar parametrelerde azalma sağlandığı rapor edilmiştir ve antioksidan kullanımının periodontitis tedavisinde fayda sağlayabileceği belirtilmiştir (Di Paola ve ark 2005).

Literatürde Vitamin E'nin periodontal doku sağlığına etkisini araştıran çalışmalar sınrlıdır (Royack ve ark 2000, Asman ve ark 1994, Parrish ve ark 1977, Kim ve Shklar 1983). Vitamin E'nin hidroksil radikallerinin oral epitelyal hücrelerde meydana getirdiği oksidatif stresi azaltıcı etkisi olduğu (Royack ve ark 2000) ve fagositik enflamatuvar hücrelerden salınan serbest oksijen radikallerini baskıladığı rapor edilmiştir (Asman ve ark 1994). Ancak, E vitamini eksikliğinin periodontal dokularda meydana gelen yıkım üzerinde etkisi olmadığı (Parrish ve ark 1977) gösterilirken, yara iyileşmesini de hızlandırdığı belirtilmektedir (Kim ve Shklar 1983).

Araştırmalarda periodontal doku yıkımının fazla olduğu bölgelerde DOS'ta (Brock ve ark 2004), periodontitisli bireylerde plazma (Chapple ve ark 2002, Abou Sulaiman ve Shehadeh 2010) ve serumda (Amarasena ve ark 2005) azalmış total antioksidan düzeyleri tespit edilmiş ve başlangıç periodontal tedavi sonrası bu değerlerin artış gösterdiği rapor edilmiştir (Abou Sulaiman ve Shehadeh 2010, Kim ve ark 2010). Diğer taraftan tükrükteki total antioksidan seviyesinin ileri periodontitisli bireylerde sağlıklı kontrollerden daha yüksek olduğu (Kim ve ark 2010) ya da periodontitis ve kontroller arasında fark olmadığı rapor edilmiştir (Brock ve ark 2004).

Periodontal olarak sağlıklı bireylerde yapılan çalışmalarda lokal veya sistemik vitamin konsantrasyonlarının periodontitis teşhisi konulmuş kişilerden farklılılar gösterdiği saptanmıştır. Periodontitisli bireylerdeki plazma C vitamini ve E vitamini seviyelerinin periodontal yönden sağlıklı olan bireylere göre daha düşük olduğu rapor edilmiştir (Panjamurthy ve ark 2005). Serum C vitamini seviyesi ve klinik ataşman kaybı arasındaki ilişki değerlendirildiğinde, düşük serum C vitamini

seviyesinde, yüksek serum C vitamini seviyesine göre %4 daha fazla ataşman kaybı olduğu belirtilmiştir (Amarasena ve ark 2005). D vitamini reseptöründeki gen polimorfizmi, periodontal hastalık oluşumu ve ataşman kaybıyla ilişkilendirilmiş ve D vitamininin periodontal dokular üzerine etkili olabileceği belirtilmiştir (Junior ve ark 2004, Hildebolt 2005).

Ayrıca, periodontitis ve antioksidan enzimleri araştırmak amacıyla sıçanlar üzerinde yapılan çalışmada, süperoksid dismutaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz azalmış olarak, serumdaki malondialdehit artmış olarak gözlenmiştir (Sobaniec ve Sobaniec-Lotowska 2000). Periodontitisli ve sağlıklı bireylerde dişeti dokusundaki ve DOS'daki süperoksit dismutaz aktivitesi araştırılmak üzere yapılan çalışmada DOS'daki süperoksit dismutaz aktivitesinin periodontitis ve sağlıklılar arasında bir farkı olmadığı ancak dişeti dokusunda süperoksid dismutaz aktivitesinin periodontitisli bireylerde kontrole göre anlamlı bir şekilde daha yüksek olduğu bulunmuştur (Akalın ve ark 2005). Dişeti oluğu sıvısı glutatyon seviyesinin periodontitisli bireylerde sağlıklılara oranla daha düşük oluğu rapor edilmiştir (Chapple ve ark 2002). Kronik periodontitisli hastalarda DOS ve tükrük melatonin konsantrasyonlarının sağlıklı bireylere oranla daha düşük bulunduğu belirtilmiş ve melatonin'in periodontal hastalıktan korunmada koruyucu bir rol oynayabileceği rapor edilmiştir (Srinath ve ark 2010).

1.7.3. Diyabet, Periodontitis ve Antioksidanlar

Diyabet teşhisi konulmuş peridontitisli bireylerde dişeti sağlığı ve antioksidan düzeyi arasında ilişkiyi rapor eden çalışmalar (Cutando ve ark 2003, Reznick ve ark 2006, Gümüş ve ark 2009) olmasına karşın sistemik ilave kullanımı ile ilgili bir araştırma tespit edilememiştir. Diyabetik hastalarda plazma ve tükrük melatonin düzeyleri kontrol grubuna göre daha düşük bulunmuştur. IL-2 seviyesinin ise periodontal durum kötüleştikce azaldığı rapor edilmiştir. Tükrük melatonin salgısının periodontitis oluşumunda koruyucu bir etkisinin olabileceği belirtilmiştir (Cutando ve ark 2003). Tip 1 DM bireylerdeki tükrük total antioksidan seviyesinin hem kontrollü hem kontrölsüz diyabetiklerde, diyabet olmayanlara göre artığı, fakat serum total antioksidan seviyelerinin az miktarda bir düşüş gösterdiği rapor edilmiştir (Reznick ve ark 2006). Periodontitis teşhisi konmuş, Tip 1 ve Tip 2 diyabetik hastalar ve sağlıklı bireylerin tükrük azalmış-glutatyon, okside glutatyon, C

vitamini, ürik asit, total antioksidan düzeyleri incelenmiş ve Tip 1 diyabetli bireylerde diğer iki gruba göre azalmış-glutatyon konsantrasyonunun daha düşük olduğu rapor edilmiştir. Azalmış-glutatyon konsantrasyonu ile sondlama derinliği arasında pozitif ilişki olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca okside glutatyon seviyesinin Tip 1 diyabetli grupta sağlıklı gruba göre daha düşük olduğu belirtilmiştir. Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (Gümüş ve ark 2009).

Periodontitis ve diyabet birçok faktörün etkilediği, çevresel, immunolojik ve genetik bazı ortak noktaları bulunan ve patogenezleri yönüyle benzerlikler gösteren hastalıklardır. Diyabet periodontal hastalık için bir risk faktörü olmakla birlikte periodontitis diyabetin bir komplikasyonu olarak kabul edilmektedir (Iacopino 2001, Borrell ve ark 2005, Campus ve ark 2005). Özellikle diyabette hiperglisemi ile birlikte ROT'lerde artış, azalmış antioksidan savunması, enzimatik yollardaki değişimler gibi oksidatif stres kaynaklarının önem kazandığı bilinmektedir (Jakus 2000, Vincent ve ark 2005). Diyabetik bireylerde E vitamininin çeşitli dokular üzerinde olumlu etkileri olduğu rapor edilmiştir (Bursell ve ark 1999, Wan Nazaimoon ve Khalid 2002, Pekiner ve ark 2003, Manning ve ark 2004). Ayrıca periodontal dokularda da antioksidanların faydalı etkileri olabileceği belirtilmiştir (Di Paola ve ark 2005, Neiva ve ark 2005, Tomofuji ve ark 2009). Bu çalışma diyabet ve periodontitis varlığında dokuda enflamatuvar değişimlerin olduğu, sitokin düzeylerinin değiştiği ve antioksidan savunma sistemindeki hasarla birlikte NO, iNOS düzeyinde artışla birlikte apoptotik hücre ölümünün etkilenebileceği (Balakirev ve ark 1997, Manderscheid ve ark 2001, Correa ve ark 2008, Pan ve ark 2010, Santos ve ark 2010) hipotezinden yola çıkılarak bu yıkımın önlenmesinde Vitamin E'nin etkisinin araştırılması üzerine kurulmuştur. Ayrıca, araştırmada hiperglisemik diyabet grubuna ilave olarak glisemik kontrolün sağlandığı bir grup oluşturulmuş ve bu gruba insülin tedavisi uygulanmıştır. Bu araştırmada, diyabet olmayan, kontrolsüz ve kontrollü diyabeti olan deneysel periodontitisli sıçanlarda insülin/α-tokoferol uygulamasının histometrik alveoler kemik kaybı, serum IL-1, IL-4, IL-6 konsantrasyonları ve dişeti iNOS+ ve CD95+ hücre sayıları üzerine etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Deney Hayvanları

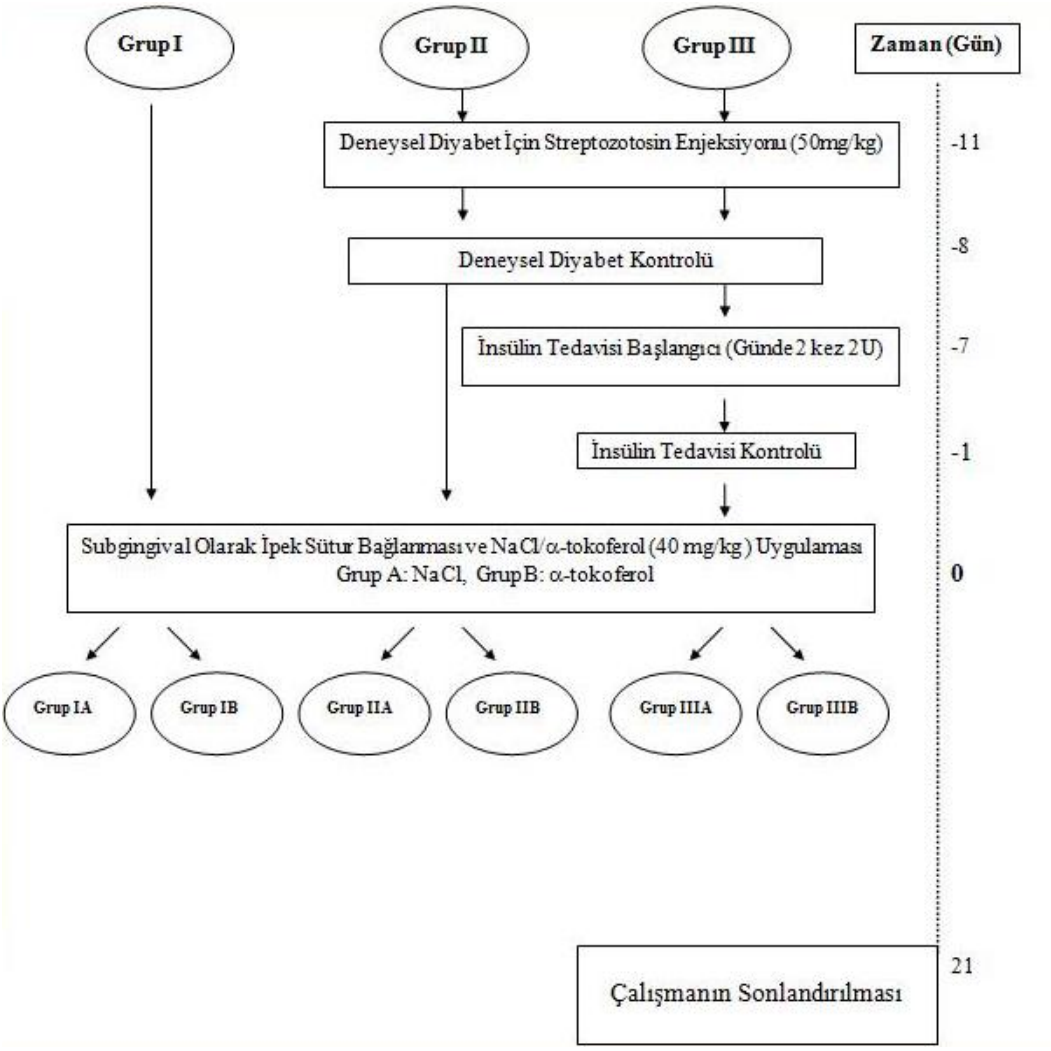
Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi Etik Kurulun'dan (2008/54) onay almıştır. Çalışmaya aynı merkezden elde edilen 60 erkek Sprague Dawley sıçan (ortalama 300 g) dahil edildi. Sıçanlar aynı merkezde beşerli gruplar halinde ayrı ayrı kafeslere konularak sadece standart sıçan yemi ve su ile beslendi.

2.2. Deneysel Çalışma Modeli

Şekil 2.1'de deneysel çalışma modeli verildi. Araştırmada kontrol grubunu oluşturmak üzere sıçanların 20'sine deneysel diyabet oluşturulmadı (Grup I). Kalan 40 sıçan da deneysel diyabet oluşturmak üzere ayrıldı. Geri dönüşümsüz deneysel diyabet oluşturmak için 50mg/kg streptozotosin (STZ) (Sigma-Aldrich 1g, USA) intraperitoniyal (IP) olarak enjekte edildi. Enjeksiyondan üç gün sonra sıçanların kuyruklarından kan örneği alınarak plazma glukoz seviyelerinin 300 mg/dl'nin üzerinde olduğu belirlendi ve sıçanlar diyabetik olarak kabul edildi. Deneysel diyabet oluşturulmuş 40 sıçanın yarısı "kontrolsüz diyabet" (Grup II, n=20) ve diğer yarısı da insülin tedavisi gören "kontrollü diyabet" grubunu (Grup III, n=20) oluşturdu. Diyabet oluşturulduktan bir gün sonra 20 sıçana (Grup III) yedi gün boyunca günde iki kez 2 ünite (U) insülin (%30 çözünür insülin aspartat ve %70 insülin aspartat protamin kristalleri içeren 100 U/ml) (Novo Nordisk, Fransa) intramuskuler (IM) olarak uygulandı ve glisemik kontrolün başarısı değerlendirildi. Çalışmanın başlangıcından 10 gün sonra anestezi (Ketamin 30mg/kg IM ve Rompun 5mg/kg IM) altında tüm sıçanların sağ mandibular birinci molar dişlerine 3/0 ipek sütur subgingival olarak yerleştirildi. Daha sonra her bir grubun (Grup I, Grup II, Grup III) yarısına 21 gün boyunca her gün günde bir kez serum fizyolojik (%0.9 NaCl) (Grup IA, Grup IIA, Grup IIIA) ve diğer yarısına α-tokoferol (Sigma- Aldrich T3001, USA) (40 mg/kg) (Grup IB, Grup IIB, Grup IIIB) IP olarak uygulandı.

Araştırmanın sonunda anestezi altında sıçanlardan kardiyak ponksiyon ile 10 cc kan alındı. Alınan kan örnekleri tüplere konuldu (Vacutest, İtalya) ve 3000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi. Serum ve plazma kısmı ayrılarak serum örnekleri eppendorf tüplere konuldu ve biyokimyasal analiz yapılıncaya kadar -80^0C'de saklandı.

İmmuno-histokimyasal inceleme için yüksek doz anestezik madde enjekte edilerek dekapite edilen sıçanların alt çeneleri çıkarılarak %10'luk formaldehit içerisine konuldu.



Şekil 2.1. Deneysel çalışma modeli.



Resim 2.1. İmmunohistokimyasal inceleme için çıkarılmış olan sıçan mandibulası.

2.3. Histolojik ve İmmünohistokimyasal Analiz

2.3.1. Dokuların Hazırlanması

Sıçanlardan elde edilen örneklerin immünohistokimyasal analizi Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Patoloji Laboratuvarında değerlendirildi. Alınan tüm örnekler önce %10'luk formik asit solüsyonunda dekalsifiye edildi. Yaklaşık iki gün süren dekalsifikasyon işleminden sonra sıçanlardan elde edilen mandibulalarda birinci ve ikinci molar dişler arasında sütur atılan bölgeyi içerecek şekilde 5 mm kalınlığında örnekler alındı. Bu örnekler kasetlenerek Leica ASP 300 ototeknikon cihazında rutin doku takip işlemine alındı. Doku takip işlemi tamamlanan örnekler parafin bloklara gömüldü. Otomikrotomda lizinli lamlara "Hematoksilen Eozin", "Mason trichrom" boyası, CD95 ve iNOS immünhistokimyasal boyamaları için toplam dörder adet 5µm kalınlığında kesitler alındı.

2.3.2. İmmünohistokimyasal İnceleme

Hazırlanan parafin bloklardan mikrotom yardımıyla (Sliding microtome, Leica Jung SM 2000 Almanya) 5µ kalınlığında alınan lamdaki örnekler 56-58^{0}C' de etüvde 16 sa. bekletildi. 30 dk ksilen, 15 dk saf alkol, 15 dk. %96'lık alkolde bekletildikten sonra distile suyla iki kere yıkandı. "Retraver" aşaması için düdüklüde ph'sı altı olan sitrat tamponla 20 dk süre ile kaynatıldı. Düdüklüden sitrat tampondan çıkan lamlar bulundukları solüsyon içinde ve oda ısısında 20 dk süresince soğumaya bırakıldı. Lamların kurumamasına dikkat edilerek doku kenarları hidrofobik kalemle çizildi. Çizilen lamlar fosfatlanmış tampon "phosphate buffer solution" içine alınarak 5 dk bekletilip boyama işlemine geçildi. Hidrojen peroksitte 20 dk bekletildi ve distile suyla yıkandıktan sonra fosfatlanmış tampon'da 5 dk bekletildi. Blok "ultraviyole"de 5-15 dk bekletilip, distile suyla yıkandı ve tekrar fosfatla tamponlanmış solusyon ile yıkandı. Daha sonra bekletilmeden nemli ortamda 1 saat antikora tabi tutuldu. Antikorların fazlaları distile suyla yıkanarak fosfatlanmış tampon'da 5 dk bekletildi. Antikor olarak "Ultra Tek-Polyvalent Biotinylated Antibody" damlatılıp 20 dk bekletildi ve yıkandıktan sonra fosfatlanmış tampon'da 5 dk tutuldu. Daha sonra UltraTek HRP damlatıldı 20 dk bekletildi ve yıkanıp 5 dk fosfatlanmış tampon'da tutuldu. AEC kromojen damlatıldıktan sonra 15 dk bekletilip yıkandı ve distile suya alındı. Hematoksilen eozinle boyanarak birkaç dk geçtikten sonra çeşme suyunda 5 dk yıkanarak distile sudan geçirildi. Daha sonra 15-30 sn amonyaklı suda tutuldu ve iki defa distile suyla yıkandı. Camlar lamelle kapatılırken su bazlı kapama malzemesi (Large Volume Vision Mount) kullanıldı.

2.3.3. Parametrelerin Değerlendirilmesi

İmmünohistokimyasal değerlendirme için boyanan preparatlar Nicon Eclipse E 400 ışık mikroskobu ile incelendi. Her örnek için mikroskoba bağlı Nikon Coolpix 5000 fotoğraf makinesi ile görüntüler alındı. Olgu görüntüleri alınırken, aynı zamanda ve aynı büyütmede, uzunluk kalibrasyonu için Nikon Stage Micrometer Type A (MBM11100) görüntüsü de alındı. Tüm fotoğraflar PC ortamına aktarıldı ve Clemex Vision Lite 3,5 görüntü analizi sistemiyle değerlendirildi. İlk önce Nikon Stage Micrometer Type A (MBM11100) fotografı ile uzunluk kalibrasyonu yapıldı. Alveoler kemik kaybının belirlenmesi için mine-sement birleşimi ile alveoler kret tepesi arası beş farklı mesafe ölçüldü. Ölçümlerin aritmetik ortalaması alınarak AKK

düzeyi µm olarak kaydedildi. Birleşim epitelinin alt kısmındaki bağdokusunda iNOS ve CD95 pozitif boyanan hücre sayısı değerlendirildi. Her olguda benzer alanlar seçildi ve görüntü analizi sistemi ile 0,1 mm^2'lik alan işaretlendi. Bu alandaki pozitif boyanan CD95 ve iNOS hücreler işaretlenerek görüntü analizi sistemine otomatik olarak saydırıldı. Hasarlı hücreler değerlendirme dışı tutuldu. Okuyucu olgunun özelliklerini ve boyanan belirleyicileri bilmeden değerlendirme yaptı.

2.4. Biyokimyasal Analiz

Çalışmada sıçanlardan elde edilen serumlarda IL-1β, IL-4 ve IL-6 sitokin konsantrasyonları S.Ü. Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Mehmet Serpek Endokrinoloji Laboratuvarı'nda belirlenmiştir.

2.4.1 İnterlökin-1β

Serum IL-1β analizleri için sıçanlar için spesifik IL-1β ELISA ticari kitler (Invitrogen KRC0012 Rat ELISA kit) kullanıldı. Kit içerisinde verilen reaktiflerin yöntemlerine uygun sulandırmaları yapıldıktan sonra, analizde kullanılacak standartların sulandırmalarına geçildi. Bu amaçla stok standart yeterli derecede standart tamponu ile çözündürüldükten sonra 2000-31,2 pg/ml arasında 1/2'lik seri dilusyonlarla yedi adet standart hazırlandı.

Analiz için öncelikle serumların çözündürülmesi ve kitin oda ısısına gelmesi sağlanarak bütün plak yuvalarına 100 µl standart tamponu eklendi. Plağın uygun yuvalarına 100 µl standart ve 1/2 oranında standart tamponu sulandırılmış 100 µl örnek eklenerek oda ısısında üç saat inkübasyona bırakıldılar. İnkübasyonun ardından yıkama tamponu ile dört kez yıkanan plaklara 100 µl Biotin konjugat verilerek bir saat oda ısısında beklemeye bırakıldılar. Tekrar dört kez yıkanan plaklarda biotin konjugatına bağlanması amacıyla bütün yuvalara 100 µl streptavidin peroksidaz enzimi verildikten sonra tekrar 30dk inkübasyon ve dört kez yıkama işlemi uygulandı. Enzimatik reaksiyonun ardından uygun rengi elde edebilmek amacıyla 100 µl substrat çözeltisi plak yuvalarına verildi. Bu aşamada ışıktan etkilenmesinin önüne geçmek amacıyla plaklar 30 dk karanlıkta beklemeye bırakıldı. Son olarak yuvalara 100 µl stop solusyon eklenerek 450nm'de IL-1β düzeylerinin

absorbansları ve standartlara göre konsantrasyonları (pg/ml) plak okuyucu "mikroplate reader" (μQuant BIO-TEC INS. Inc, USA) kullanılarak belirlendi.

2.4.2. İnterlökin-4

Serum IL-4 düzeylerinin belirlenmesi amacıyla sıçanlar için spesifik IL-4 ELISA kitleri (RayBio, ELR-IL4-001) kullanıldı. Kit içerisinde bildirilen reaktiflerin yöntemlerine uygun sulandırmaları yapıldı ve standart sulandırmalarını yapmak amacıyla öncelikle stok standart uygun konsantrasyona getirildi. Analizde kullanmak amacıyla 160-0,66 pg/ml arasında 1/2'lik seri sulandırmalar yapılarak toplam yedi adet standart hazırlandı.

Plak ve serumların oda ısısına getirilmesinin ardından, plağın uygun yuvalarına 100 μl. standart ve serumlar verildi. Plakların iki buçuk saat oda ısısında inkübasyonun ardından dört kez yıkama tamponu ile yıkandı ve yuvalara 100 μl ikincil antikor "detection antibody" eklendi. Tekrar dört kez yıkama işlemi yapılan plak yuvalarına 100 μl treptavidin-peroksidaz enzimi verildi ve 45 dk beklemeye bırakıldılar. İkincil antikora bağlanan enzimlerin renk reaksiyonunun görülebilmesi amacıyla 100'er μl peroksidaz enziminin substratı olan tetrometil benzidin'den yuvalara eklendi. Karanlıkta 30 dk beklemeye bırakılan plaklara 50 μl stop solüsyon verilerek absorbanslar 450 nm'de plak okuyucu "mikroplate reader" (μQuant BIO-TEC INS. Inc, USA) aracılığıyla belirlendi ve konsantrasyon düzeyleri pg/ml olarak kaydedildi.

2.4.3. İnterlökin-6

Serum IL-6 düzeylerinin belirlenmesi amacıyla sıçanlar için spesifik IL-6 ticari kitleri kullanıldı (İnvitrogen KRC0062). Kitte verilen reaktiflerin yöntemlerine uygun sulandırmaları yapıldı. Standart sulandırmalarının yapılabilmesi amacıyla öncelikle stok standart standart tamponu ile yeterli düzeyde sulandırıldı. Daha sonra stok standarttan 2000-31,2 pg/ml arasında 1/2 seri sulandırmalar yapılarak toplam yedi standart elde edildi.

Plak ve serumların oda ısısına getirilmesinin ardından plağın uygun yuvalarına 100 μl standart ve 1/2 oranında standart tamponu sulandırılmış 100 μl örnek eklenerek, plaklar 37^{o}C'de iki saat bekletildiler. Daha sonra plaklar dört kez yıkama

tamponu ile yıkandı ve yuvalara 100 µl biotin konjugat verildi. Oda ısısında 1 saat inkübasyon ve tekrar dört kez yıkamanın ardından plak yuvalarına 100 µl Streptavidin-peroksidaz enzimi verilerek enzimin biotin konjugatına bağlanması sağlandı. Oda ısısında tekrar 30 dk inkübasyona bırakılan plaklarda biotin konjugatına bağlanan enzimin belirlenebilmesi amacıyla her yuvaya 100 µl substrat çözeltisi ilave edildi. Yeterli rengin oluşabilmesi için karanlıkta ve oda ısısında 30 dk beklemeye bırakılan plaklara son olarak 100 µl Stop solüsyon verildi. İnterlökin-6 konsantrasyonları (pg/ml) absorbansların 450 nm'de plak okuyucu "mikroplate reader" (µQuant BIO-TEC INS. Inc, USA) aracılığıyla okunmasıyla belirlendi.

2.5. Verilerin İstatistiksel Analizi

İstatistiksel analiz "Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 17.0" paket programı ile yapıldı. Çalışmaya dahil edilen gruplar arasındaki farkın değerlendirilmesi için öncelikle iki yönlü varyans analizi yapıldı. Gruplar arası farkın önemli olduğu veriler için tek yönlü varyans analizi ve Tukey HSD ile değerlendirildi. İstatistiksel olarak $p<0,05$ önemli olarak kabul edildi.

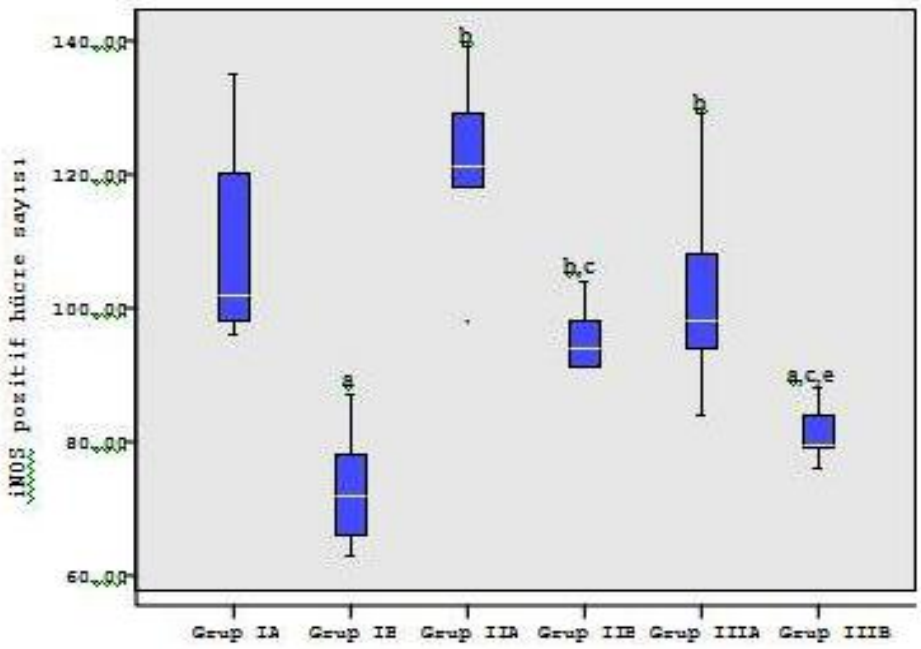
3. BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen toplam 60 sıçandan, bir sıçan Grup IB'den, ikişer sıçan Grup IA, IIB, IIIA, IIIB'den, üç tanesi de Grup IIA'dan kaybedildi ve araştırma 48 sıçanla tamamlandı. Morfometrik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal değerlerden okunamayan örneklerin istatistiksel analizi yapılmadı.

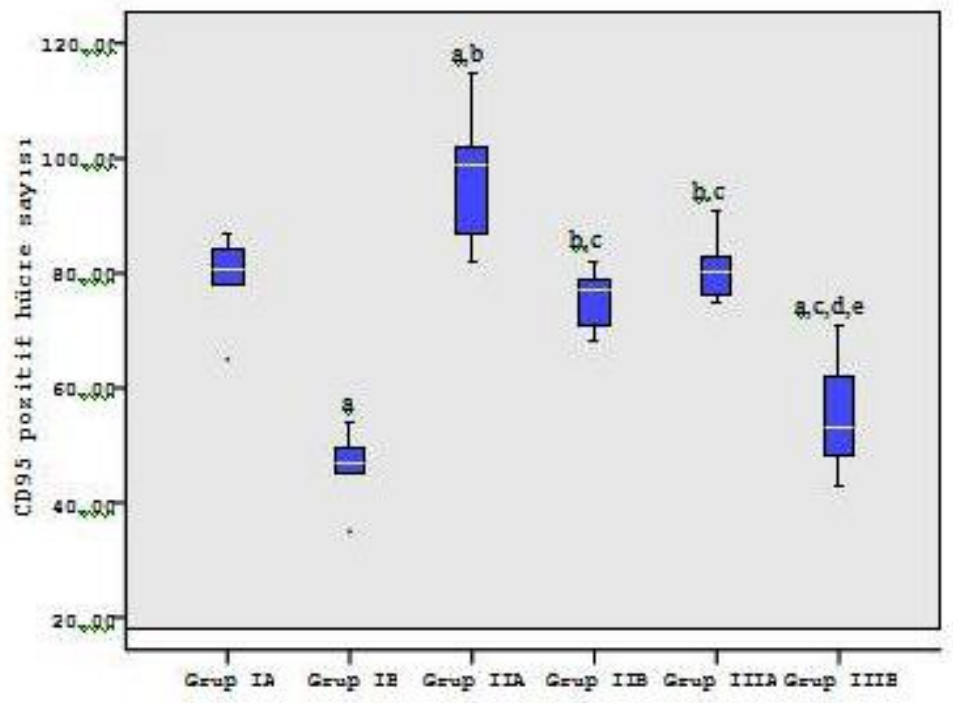
Tablo 3.1. Alveoler kemik kaybı (AKK), CD95 ve iNOS pozitif boyanan hücre sayıları ve serum IL-1β, IL-4, IL-6 konsantrasyonlarının ortalama (ort), standart sapma (Ss), ortanca, en küçük "minimum" (min) ve en büyük "maksimum" (maks) değerleri.

	GRUP I		**GRUP II**		**GRUP III**	
	A	**B**	**A**	**B**	**A**	**B**
AKK						
n	8	6	7	8	8	8
Ort± Ss	484,1±68,7	583,6±61,6	454,8±123,4	500,5±144,4	551±113,2	427,4±120,2
Ortanca	459,5	570,5	482,1	565,9	570,5	441,5
Min-Maks	418-622	521-688	323,5-597,8	269,4-607,3	290-666	271,1-572
IL-1β						
n	6	6	3	8	8	7
Ort± Ss	4,9±3,1	1,8 ±1,87	3,4 ±2,2	6,5±3,6	7,5± 4,9	5,4±2,5
Ortanca	3,69	0,87	2,17	6,08	6,08	5,65
Min-Maks	1,31-9,57	0,44-5,22	2,17-6,09	0,87-12,61	0,87-16,52	1,74-9,57
IL-4						
n	8	9	6	6	8	8
Ort± Ss	0,29±0,04	0,2±0,03	0,36±0,09	0,49±0,46	0,3±0,14	0,3±0,02
Ortanca	0,27	0,28	0,32	0,3	0,27	0,31
Min-Maks	0,22-0,36	0,23-0,33	0,28-0,54	0,28-1,45	0,21-0,66	0,29-0,38
IL-6						
n	8	9	7	8	8	8
Ort± Ss	32,5±5,7	27,2±8,2	50,9±39,1	42,8±14,5	31,3 ±4,7	35,2±16,4
Ortanca	31,87	25,81	36,13	40,04	32,59	28,31
Min-Maks	23,12-39,73	19,53-44,22	26,71-137,85	30,55-74,68	22,73-37,25	21,24-61,84
iNOS						
n	6	7	6	6	6	6
Ort± Ss	108,8 ±15,5	72,8±8,6 [a]	121±13,6 [b]	95,3 ±5,1 [b.c]	101,8 ±15,4 [b]	81±4,2 [a.c.e]
Ortanca	102	72	121	94	98	79,5
Min-Maks	96-135	63-87	98-139	91-104	84-129	76-88
CD 95						
n	6	7	6	6	6	6
Ort± Ss	79,1±7,6	46,4±5,9 [a]	97,3±11,8 [a.b]	75,6 ±5,2 [b.c]	80,8±5,8 [b.c]	55±10 [a.c.d.e]
Ortanca	80,5	47	99	77	80	53
Min-Maks	65-87	35-54	82-115	68-82	75-91	43-71

İki yönlü varyans analizine göre CD95 ve iNOS pozitif hücre sayıları gruplar arasında anlamlı farklı ($p<0.05$), ve AKK (μm), IL-1β (pg/ml), IL-4 (pg/ml) ve IL-6 (pg/ml) yönünden benzer bulundu ($p>0,05$). Tek yönlü varyans analizi ve Tukey HSD yapıldı. İstatistiksel anlamlı fark ($p<0,05$). **a:** Grup IA'ya göre farklılık, **b:** Grup IB'ye göre farklılık, **c:** Grup IIA'ya göre farklılık, **d:** Grup IIB'ye göre farklılık, **e:** Grup IIIA'ya göre farklılık.

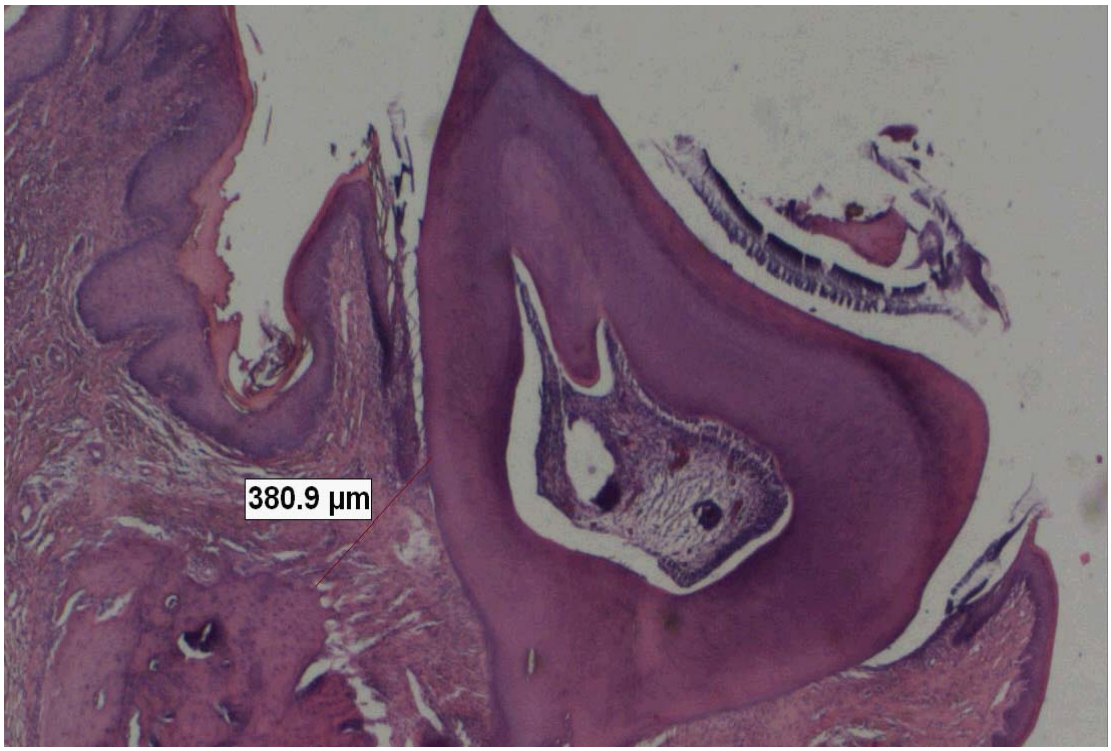


Grafik 3.1. Tek yönlü varyans analizi ve Tukey HSD sonuçlarına göre; **a:** Grup IA'ya göre fark, **b:** Grup IB'ye göre fark, **c:** Grup IIA'ya göre fark, **d:** Grup IIB'ye göre fark, **e:** Grup IIIA'ya göre fark ($p<0,05$).

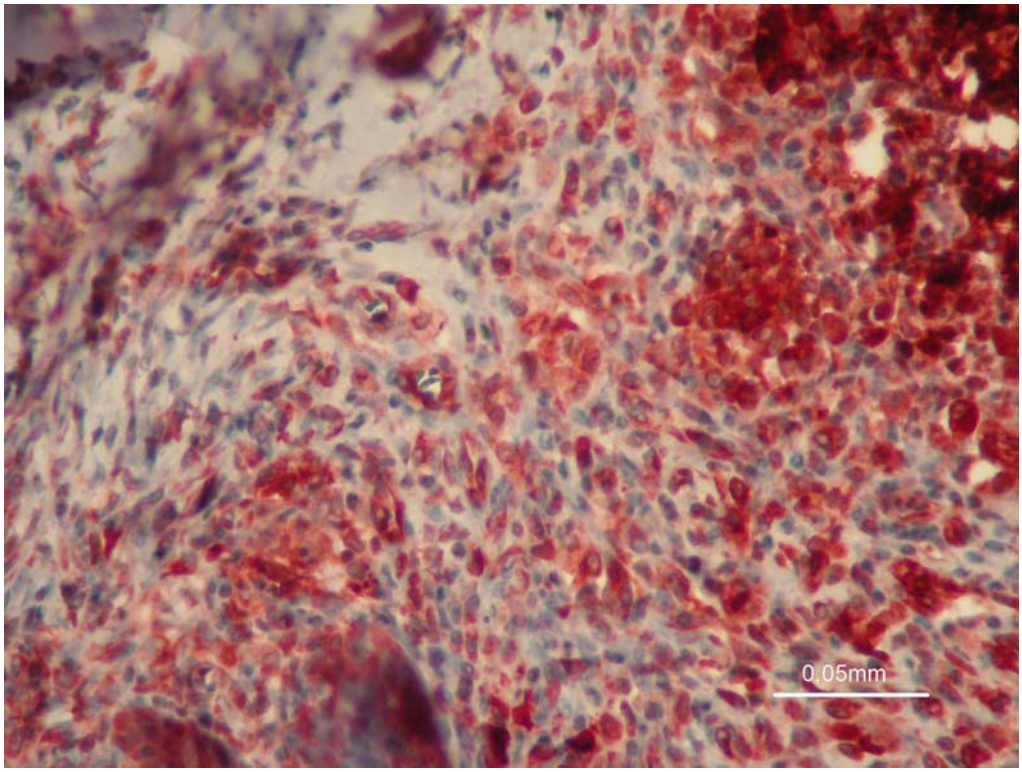


Grafik 3.2. Tek yönlü varyans analizi ve Tukey HSD sonuçlarına göre; **a:** Grup IA'ya göre fark, **b:** Grup IB'ye göre fark, **c:** Grup IIA'ya göre fark, **d:** Grup IIB'ye göre fark, **e:** Grup IIIA'ya göre fark($p<0,05$).

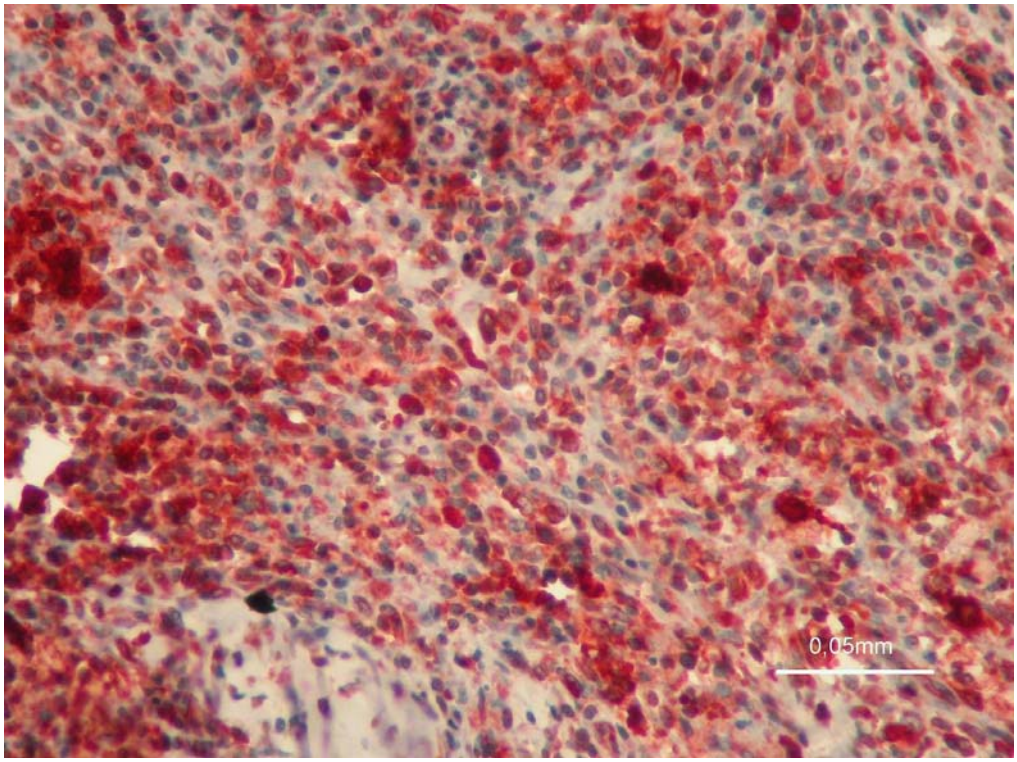
İki yönlü varyans analizi sonuçlarına göre, Grup I, II ve III için iNOS (Grafik 3.1) ve CD95 (Grafik 3.2) ekspresyon düzeyleri farklı bulundu ($p<0,05$), ancak, AKK, IL-1β, IL-4 ve IL-6 konsantrasyonları yönünden önemli farklılık yoktu ($p>0,05$). Kontrolsüz diyabet grubundaki sıçanlardan (Grup II) alınan kesitlerdeki CD95 ve iNOS hücre sayılarının, Grup I ve Grup II'den daha yüksek olduğu saptandı ($p<0,05$). Alfa tokoferol uygulanan tüm sıçanlarda (Grup IB, IIB, IIIB) pozitif boyanan iNOS (Resim 3.3, Resim 3.5, Resim 3.7, Resim 3.9, Resim 3.11, Resim 3.13) ve CD95 (Resim 3.2, Resim 3.4, Resim 3.6, Resim 3.8, Resim 3.10, Resim 3.12) hücre sayıları, serum fizyolojik enjekte edilen (Grup IA, IIA, IIIA) tüm sıçanlardan farklı bulundu ($p<0,05$).



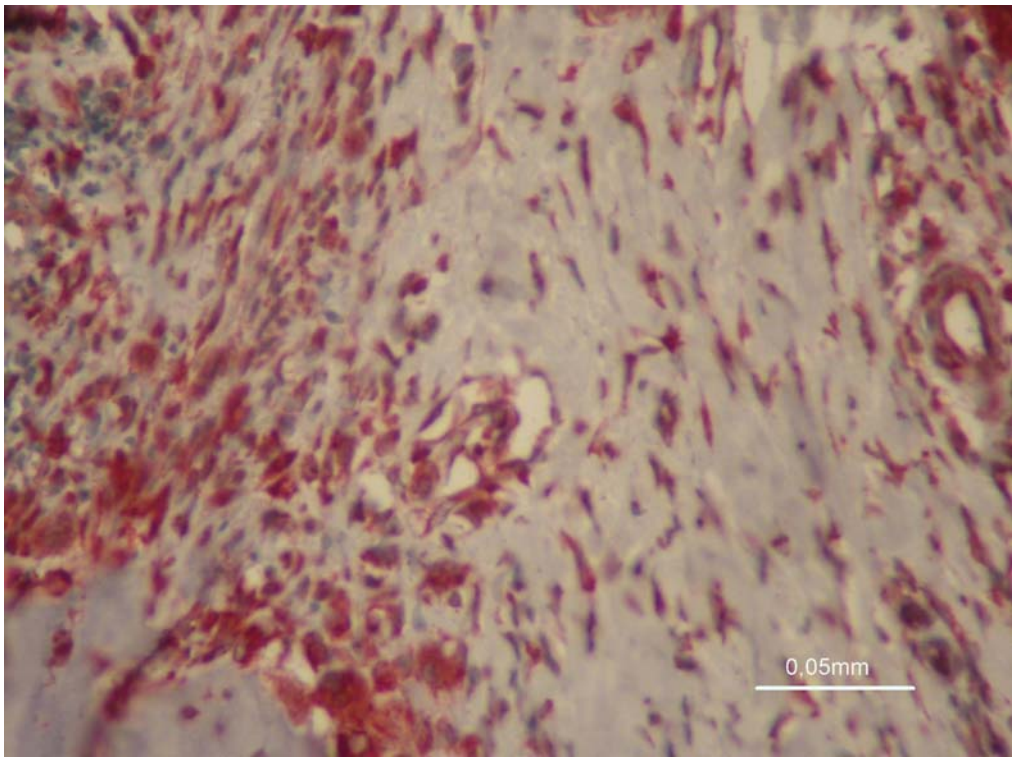
Resim 3.1. Hematoksilen-Eosin ile boyanmış kesit ve AKK (µm) ölçümü.



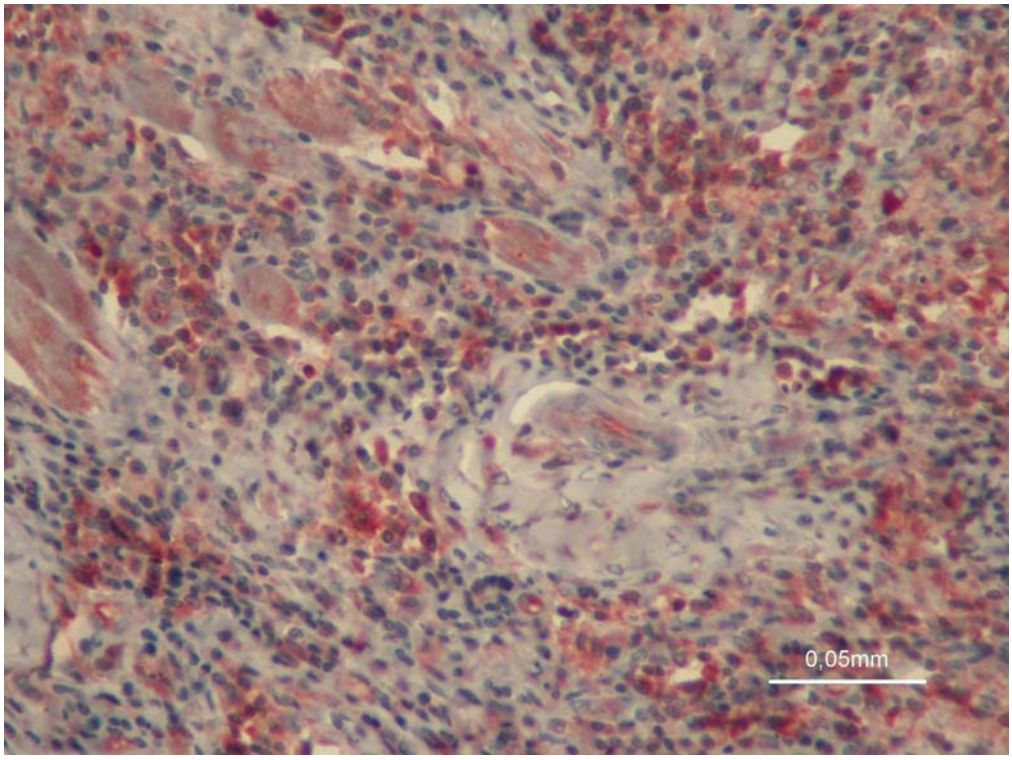
Resim 3.2. Grup IA grubuna ait kesitlerde CD95 + boyanan hücrelerin görüntüsü.



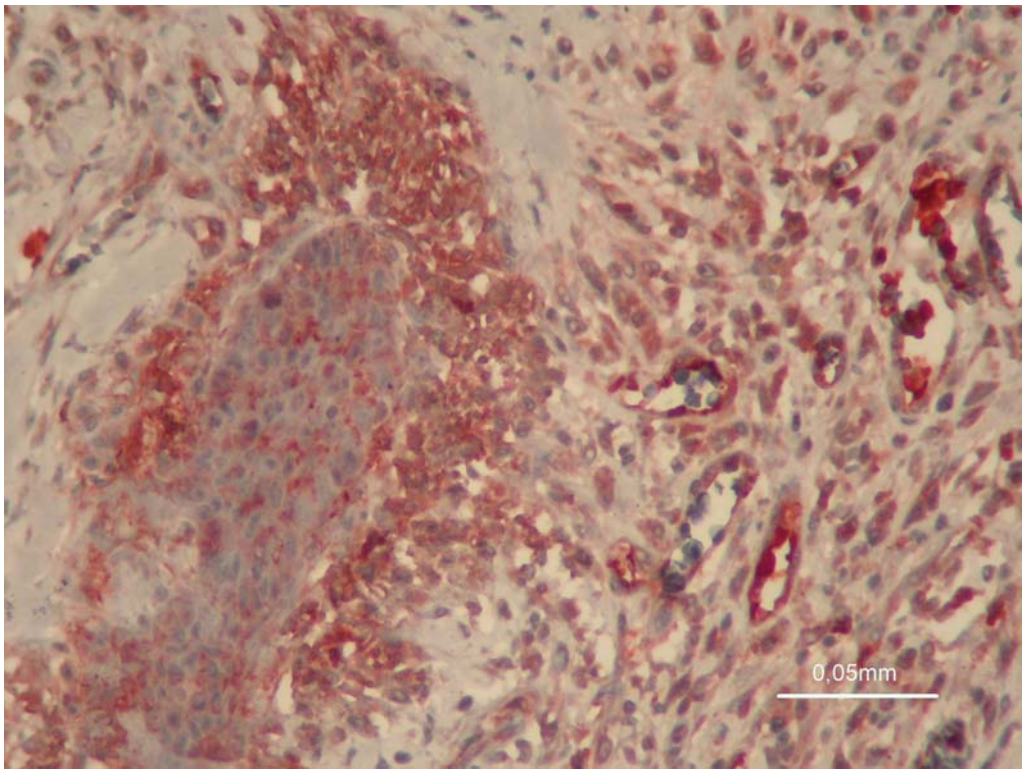
Resim 3.3. Grup IA grubuna ait kesitlerde İNOS + boyanan hücrelerin görüntüsü.



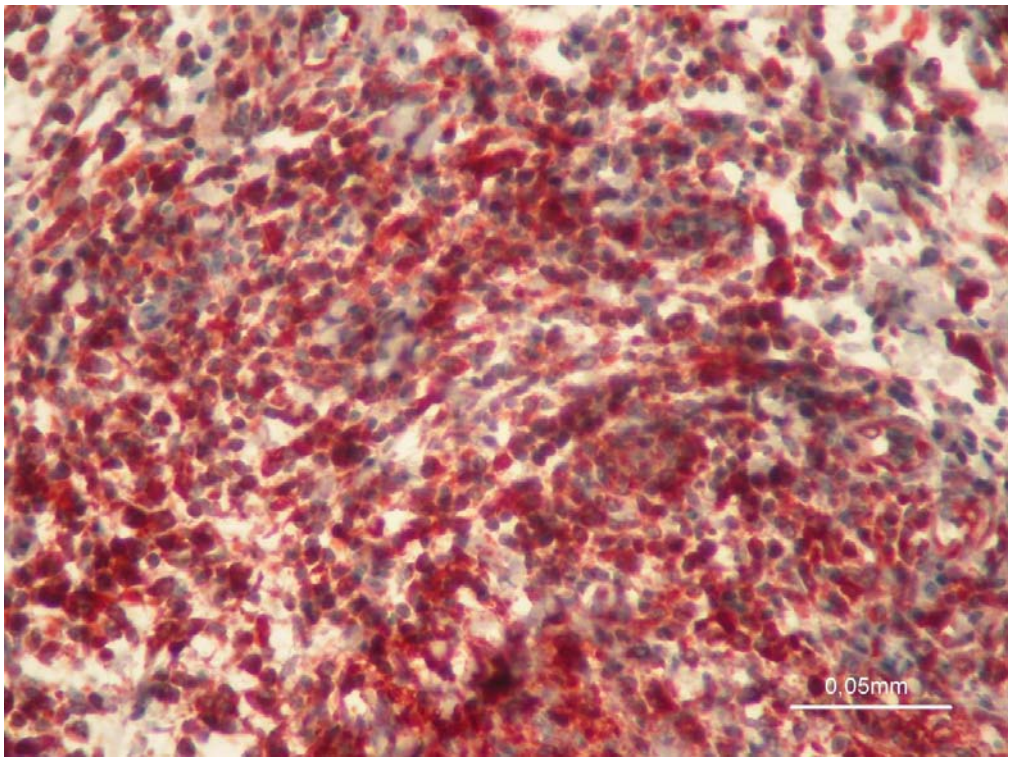
Resim 3.4. Grup IB grubuna ait kesitlerde CD95 + boyanan hücrelerin görüntüsü.



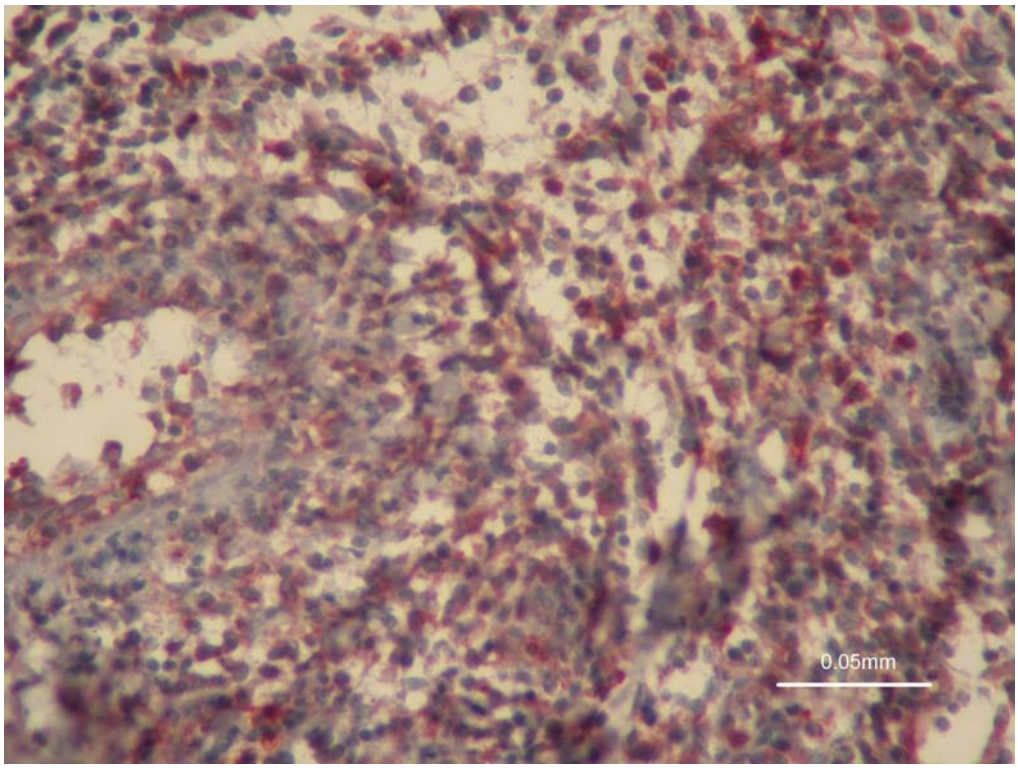
Resim 3.5. Grup IB grubuna ait kesitlerde iNOS + boyanan hücrelerin görüntüsü.



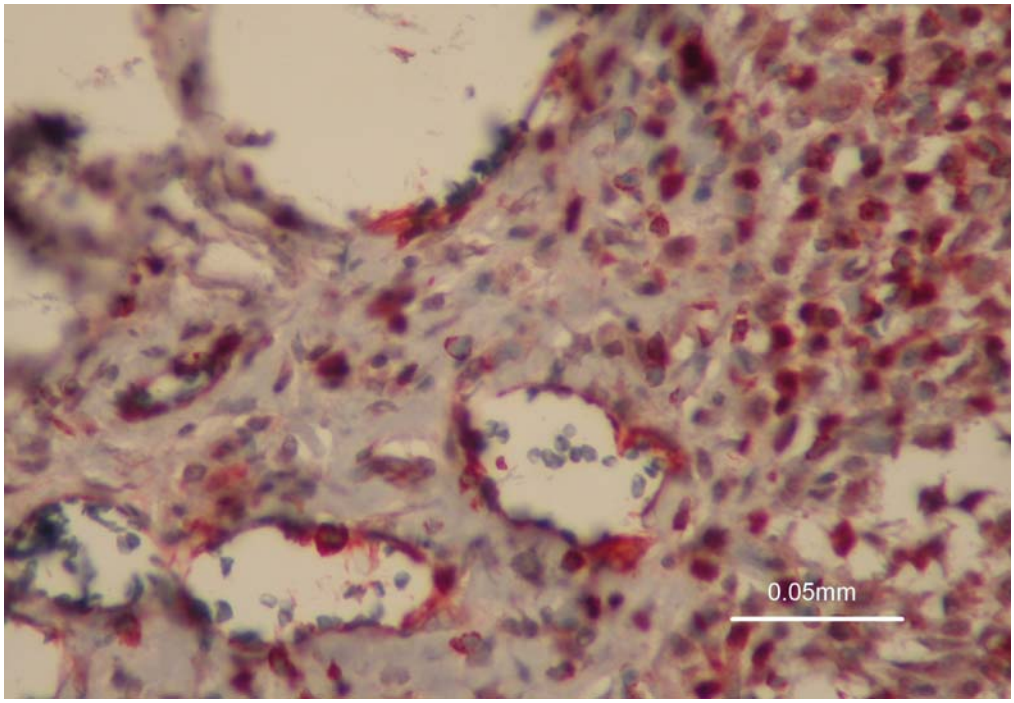
Resim 3.6. Grup IIA grubuna ait kesitlerde CD95 + boyanan hücrelerin görüntüsü.



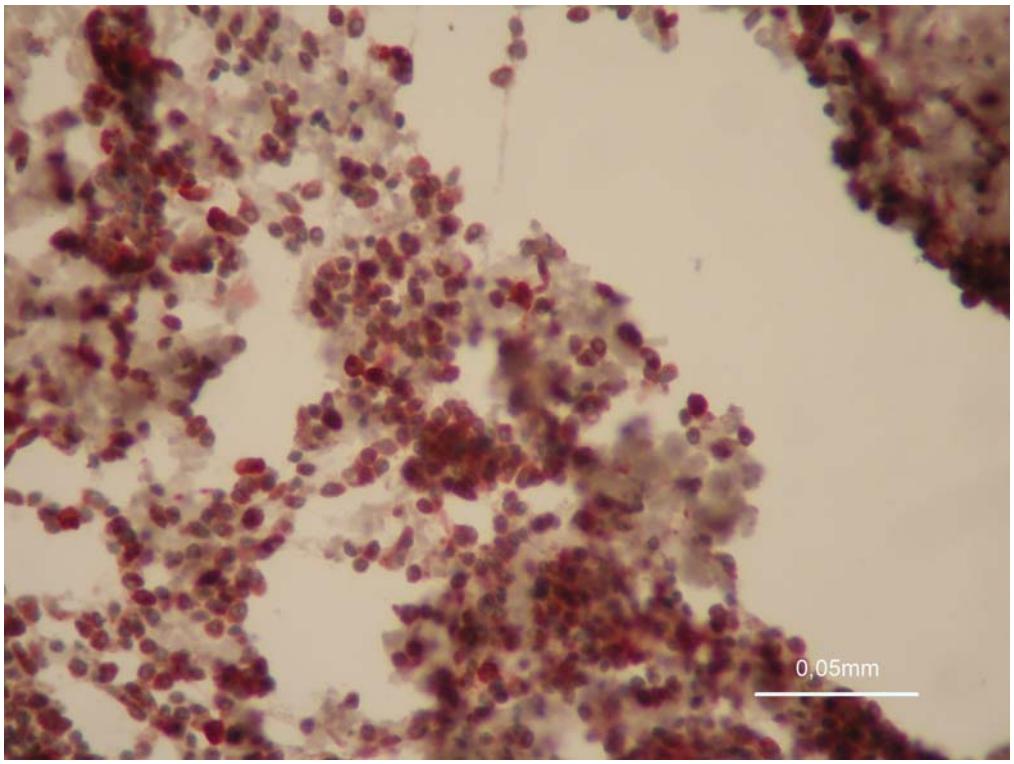
Resim 3.7. Grup IIA grubuna ait kesitlerde iNOS + boyanan hücrelerin görüntüsü.



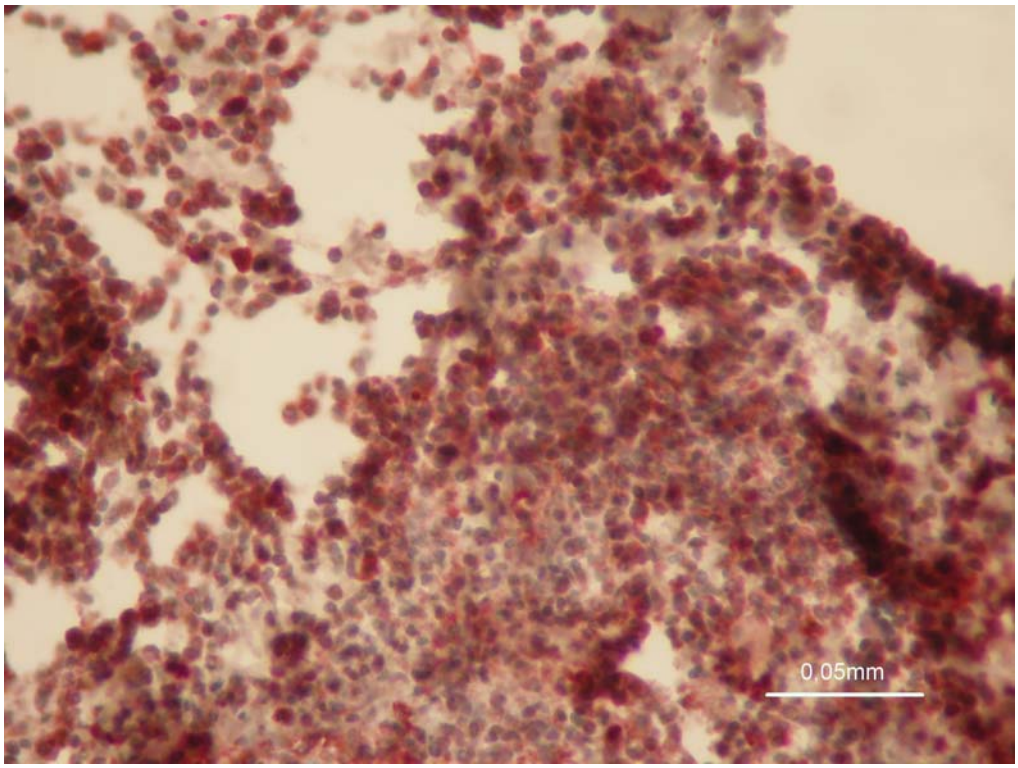
Resim 3.8. Grup IIB grubuna ait kesitlerde CD95 + boyanan hücrelerin görüntüsü.



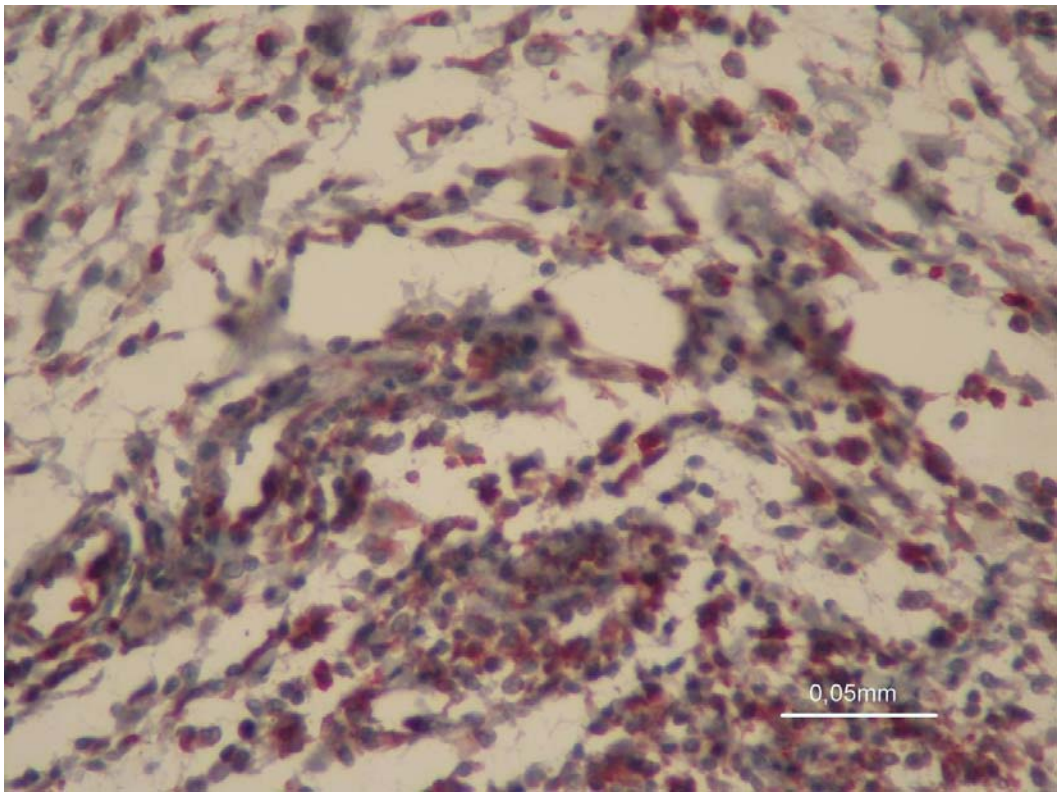
Resim 3.9. Grup IIB grubuna ait kesitlerde iNOS + boyanan hücrelerin görüntüsü.



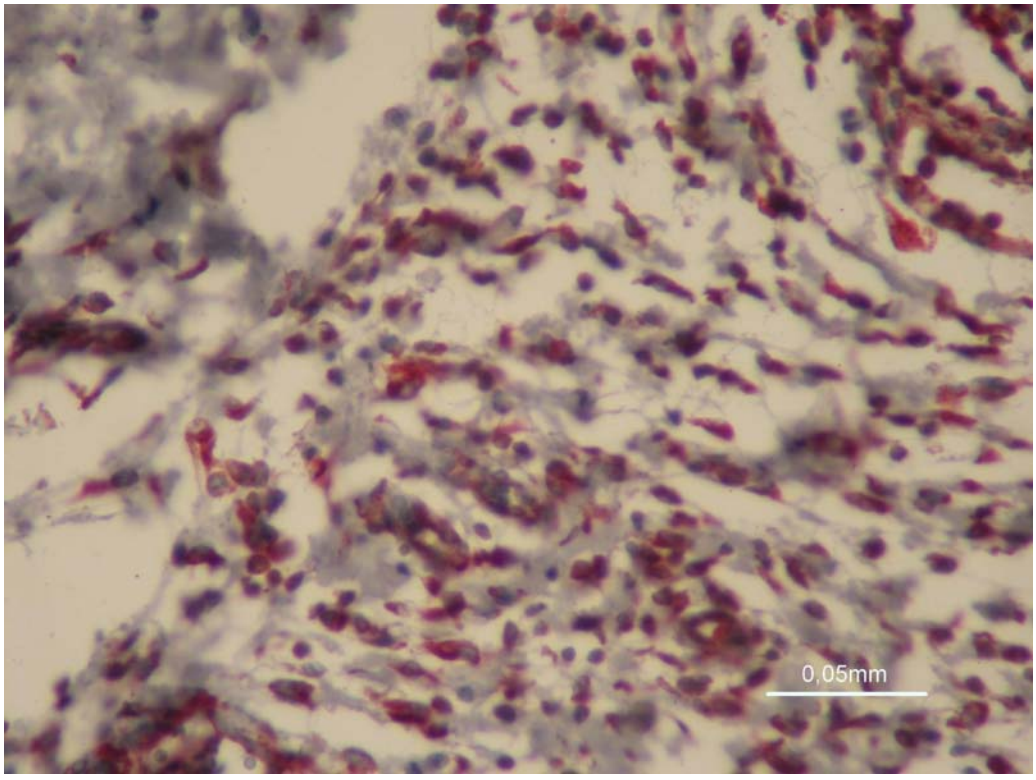
Resim 3.10. Grup IIIA grubuna ait kesitlerde CD95 + boyanan hücrelerin görüntüsü.



Resim 3.11. Grup IIIA grubuna ait kesitlerde iNOS + boyanan hücrelerin görüntüsü.



Resim 3.12. Grup IIIB grubuna ait kesitlerde CD95 + boyanan hücrelerin görüntüsü.



Resim 3.13. Grup IIIB grubuna ait kesitlerde İNOS + boyanan hücrelerin görüntüsü.

4. TARTIŞMA

Diyabetin kontrol altına alınamamasıyla birlikte bozulan glisemik dengenin düzenlenmesinde yardımcı olarak antioksidanların kullanılabileceği ileri sürülmektedir (Sjöholm ve ark 2000, Wan Nazaimoon ve Khalid 2002, Viana ve ark 2003, Manning ve ark 2004, Chis ve ark 2009). Son zamanlarda, kontrolsüz diyabetle birlikte gelişen endotel hasarı, retinopati, nöropati, anjiyopati gibi birçok problemin giderilmesinde yardımcı olarak E vitamini ve α-tokoferol gibi türevlerin kullanımına olan ilgi artmıştır (Bursell ve ark 1999, Davi ve ark 1999, Gökkuşu ve ark 2001, Çelik ve ark 2002, Pekiner ve ark 2003, Viana ve ark 2003, Seven ve ark 2004). Özellikle Tip 1 diyabetik bireylerin tedavisinde insülin kullanımı zorunlu olmasına karşın E vitamini kullanımının oksidatif stresi dengelediği, NO gibi beta hücrelerinden insülin salınımını azaltan maddelerin etkilerini baskılayarak insülin üretimini arttırdığı, membranın fiziksel özelliklerini iyileştirerek glukozun taşınmasına yardımcı olduğu belirtilmektedir (Paolisso ve ark 1993, Sharma ve ark 2000, Jain ve ark 2000, Ihara ve ark 2000, Sjöholm ve ark 2000, Wan Nazaimoon ve Khalid 2002, Vinik ve Vinik 2003, Manning ve ark 2004). Bu çalışmada sistemik olarak sağlıklı (Grup I), Tip I kontrolsüz (Grup II) ve kontrollü (Grup III) diyabeti olan tüm sıçanların molar dişlerine sütur bağlanarak deneysel periodontitis oluşturulmuş, her bir gruba α-tokoferol uygulanarak AKK histometrik olarak ölçülmüş ve dişeti iNOS ve CD95 pozitif boyanan hücre sayısı immünohistokimyasal yöntemle boyanan preparatların bilgisayar ortamına aktarılan dijital fotoğraflarının görüntü analiz sistemiyle değerlendirilmesiyle belirlenmiştir. Ayrıca, serum IL-1β, IL-4 ve IL-6 konsantrasyonları da değerlendirilmiştir. Bu araştırmanın sonunda sadece insülin tedavisi incelendiğinde insülinin özellikle dişeti CD95 pozitif hücre sayısını baskıladığı ve en yüksek CD95 ekspresyonunun glisemik kontrol olmayan grupta (Grup IIA) olduğu saptandı. İnsülin tedavisi dişeti iNOS düzeyini baskılama eğilimindeydi, ancak istatistiksel olarak önemli değildi. Alfa-tokoferol uygulaması değerlendirildiğinde tüm gruplarda α-tokoferol'ün etkin olarak iNOS ve CD95 pozitif boyanan hücre sayısını baskıladığı saptandı. Alfa-tokoferol'ün insülin'in etkinliğini arttırdığı ve insülin verilen grubun (Grup IIIB) kontrol grubuna (Grup IB) benzer düzeylerde dişeti CD95 ekspresyonu gösterdiği bulundu. En yüksek dişeti CD95 düzeyleri glisemik kontrolün olmadığı (Grup IIB) grupta tespit

edildi. Ayrıca, α-tokoferol'ün insülin verilmeyen grupta (Grup IIB) da etkin olduğu ve Grup IIB'deki dişeti iNOS ve CD95 düzeylerinin sadece serum fizyolojik verilen kontrol (Grup IA) /insülin tedavisi uygulanan (Grup IIIA) gruplardan farklı olmadığı tespit edildi. Ancak, bu araştırmanın sınırları içerisinde α-tokoferol'ün AKK ve serum sitokin düzeyleri üzerine bir etkisi tespit edilmedi.

4.1. Deneysel Hayvan Modeli

Sıçanların immunolojik ve mikrobiyolojik özelliklerinin yanında periodontal dokularının histolojik durumları insanlarla benzerlik gösterir. Ayrıca, biyomateryal kullanımı ve periodontal hastalık etiyolojisinin değerlendirilmesinde kolaylık sağlarlar. Bu özelliklerinden dolayı deneysel periodontitis oluşturulmasında sıçanların kullanılmaları gündeme gelmiştir (Weinberg ve ark 1999, Struillou ve ark 2010). Sıçanların molar dişlerine ligatür bağlanarak oluşturulan deneysel periodontitis modeli birçok çalışmada kullanılmıştır (Lohinai ve ark 1998, Kuhr ve ark 2004, Di Paola ve ark 2005, Andersen ve ark 2006, Di Paola ve ark 2006, Leitão ve ark 2004, Leitão ve ark 2005, Tomofuji ve ark 2009). Alveoler kemik yıkımının ilk on beş günde yoğun olması ve daha sonra azalarak devam etmesi açısından alveoler kemik kaybının ligatür bağlandıktan sonra kısa sürede oluştuğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Bezerra ve ark 2000, Holzhausen ve ark 2004, Kuhr ve ark 2004, Di Paola ve ark 2005, Di Paola ve ark 2006, Muià ve ark 2006, Toker ve ark 2009). Bu çalışmada streptozotosin uygulamasını takiben üçüncü günde insülin tedavisine başlanmış ve onuncu günde sıçanların sağ alt birinci molar dişlerine 3/0 ipek sütur materyali bağlanmıştır. Deneysel diyabet oluşturulan kontrollü ve kontrolsüz diyabet grupları ve diyabet oluşturulmayan kontrol gruplarına aynı anda sütur bağlanmıştır. Sütur bağlanmasını takiben 21. günde tüm sıçanlar kurban edilmiş ve bu sürenin sonunda deneysel periodontitisle birlikte alveoler kemik kaybı oluşturulmuştur.

4.2. Alveoler Kemik Kaybı

Diyabetik bireylerde kemik metabolizmasında değişiklikler meydana gelmektedir (Jehle ve ark 1998, Petrova ve ark 2005, Gerdhem ve ark 2005, Pastor ve ark 2000). Diyabetli yaşlı kadınlarda kemik yoğunluğunun arttığı ve kemik yapım ve yıkım arasındaki dengenin bozulduğu rapor edilmiştir (Gerdhem ve ark 2005).

Ayrıca, Tip 1 diyabette insülin benzeri büyüme faktörü üyeleriyle, proinsülin eksikliği arasındaki düzensizliğin kemik mineral yoğunluğundaki azalmaya katkı sağlayabileceği belirtilmiştir (Jehle ve ark 1998). Diyabetik retinopati (Pastor ve ark 2000) ve periferal nöropati (Rix ve ark 1999) olan bireylerde sistemik kemik mineral yoğunluğunda azalma, osteopeni ve osteoporozun geliştiği ve mevcut kaybın bu bulguları taşımayan diyabetiklerden daha belirgin olduğu rapor edilmiştir. Holzhausen ve ark (2004) sıçanlarda streptozotosinle tip I diyabet ve ligatürle deneysel periodontitis oluşturarak 7., 15. ve 30. günlerdeki radyografik alveoler kemik kaybını değerlendirmişlerdir. Deneysel periodontitis oluşturulan her iki grupta da 15 ve 30. günlerdeki AKK miktarı, 7. gündeki ölçümlere kıyasla daha fazla bulunmuştur. Ancak, glisemik kontrol olmayan "diyabetli" ve sistemik olarak sağlıklı "diyabetsiz" gruplar arasında önemli fark olmadığı rapor edilmiştir. Bu araştırmada da benzer olarak streptozotosin ile diyabet oluşturulan ve diyabet oluşturulmayan sıçanların tamamının molar dişlerine 3/0 ipek sütur bağlanarak deneysel periodontitis oluşturulmuştur. Üç haftalık çalışma sonunda alınan kesitlerde histometrik olarak AKK değerlendirilmiş ve diyabet olan ve olmayan gruplarda AKK ölçümleri benzer bulunmuştur. Bu araştırmalardaki artan kan glukoz düzeylerine karşın sert dokuda oluşabilecek olası yıkımların tespiti için üç haftalık ya da 30 günlük deneysel çalışma sürelerinin kısa olabileceği ve AKK'nın daha uzun sürelerde değerlendirilmesi gerektiği düşünülebilir.

Epidemiyolojik birçok çalışmada diyabetin periodontitis için risk faktörü olduğu ve periodontal doku yıkımının da diyabetin komplikasyonlarından birisi olarak düşünüldüğü belirtilmiştir (Katz ve ark 2001, Campus ve ark 2005, Andersen ve ark 2006, Saito ve ark 2006, Watanebe ve ark 2008). Diyabetin kontrol altına alınamaması sonucunda bozulan insülin tolerasının mevcut alveoler kemik yıkımını arttırabileceği ileri sürülmektedir (Tervonen ve ark 2000, Andersen ve ark 2006, Lappin ve ark 2009). Tervonen ve ark (2000) Tip I diyabeti olan bireylerde panoramik radyograflarda ölçülen AKK'nin sağlıklı kontrollere göre daha yüksek düzeyde olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, Tip II diyabet varlığında mevcut periodontal doku yıkımı ve değişen sitokin düzeyi ile birlikte AKK'nın da artış gösterdiği ve değerlerin periodontitisi olmayan diyabetiklerden ve sağlıklı kontrollerden daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Andersen ve ark 2006). Lappin ve ark (2009) diyabet ve/veya periodontitisi olan bireylerdeki plazma osteokalsin

düzeylerini sağlıklı gruba göre daha düşük seviyede tespit etmişlerdir. Diyabetik ve periodontitisli bireylerdeki artmış kemik yıkımının, kemik yapım belirteçlerinden olan osteokalsin düzeyindeki azalma ile açıklanabileceği belirtilmiştir. Özellikle diyabetin kontrol altına alınmasının alveoler kemik yıkımının önlenmesinde önemli olduğu gösterilmiştir (Safkan-Seppala ve Ainamo 1992, Tervonen ve ark 2000, Andersen ve ark 2006, Safkan-Seppala ve ark 2006, Saito ve ark 2006, Javed ve ark 2007, Lappin ve ark 2009). Bu araştırmada deneysel diyabet ve periodontitis oluşturulmuş sıçanlara üç haftalık çalışma süresince insülin tedavisi uygulanmış, ancak diyabetin kontrol altına alınmasının AKK yönünden ek bir katkısı tespit edilmemiştir. Elde edilen bu sonuçlar Holzhausen ve ark (2004) sonuçlarına benzerdir. Metabolik kontrolün bozulduğu kontrolsüz diyabet varlığında insülin tedavisine ek olarak Vitamin D gibi antioksidanların kullanımı gündeme gelmiş ve sistemik kemik yıkımının önlenmesinde yardımcı olarak kullanılabileceği rapor edilmiştir (Hampson ve ark 1998, Hauache ve ark 1998, Zella ve DeLuca 2003).

Antioksidanların hücre sinyalizasyonunda önemli düzenleyiciler olduğu ve kemik yıkımının önlenmesinde etkin rol üstlendiği bilinmektedir (Lean ve ark 2003, Ha ve ark 2004). Ancak, güçlü bir antioksidan olan α-tokoferol'ün sistemik kemik üzerine etkisini araştıran çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Alfa-tokoferol'ün kemik mineral yoğunluğuna (Wolf ve ark 2005) ve kemik osteokalsin düzeyleri (Norazlina ve ark 2007) üzerine etkisi olmadığı rapor edilirken, kemiklerde osteoklast sayılarını azalttığı (Ahmad ve ark 2005, Norazlina ve ark 2002), kalsiyum düzeyini (Norazlina ve ark 2002) ve osteoblast sayılarını (Norazlina ve ark 2002, Mehat ve ark 2010, Shuid ve ark 2010) arttırarak kemik oluşumunu uyardığı ve kemik dokusunun sağlığının devam etmesinde faydalı olduğu tespit edilmiştir. Soeta ve ark (2010) tarafından yapılan çalışmada δ-tokoferol ve α-tokoferol'ün osteoblast farklılaşması üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir. İlk yedi günlük dönemde α-tokoferol (100-200 μM) ve δ-tokoferol (2-20 μM) uygulamasıyla alkalen fosfataz aktivitesinin ve kalsifiye olmamış nodül sayısının azaldığı rapor edilmiştir. Ancak ondördüncü günde α-tokoferol ve δ-tokoferol uygulamasının kalsifiye nodüller üzerinde önemli bir fark oluşturmadığı ve alkalen fosfataz aktivitesinde bir değişiklik olmadığı rapor edilmiştir. Vitamin E uygulamasının osteoblast farklılaşmasını osteoid üretiminin erken fazında etkilediği belirtilmiştir.

Periodontal doku yıkımında tedaviye yardımcı olarak E vitamini uygulanmasına yönelik çalışmalar sınırlı sayıdadır (Parrish ve ark 1977, Cohen ve Meyer 1993). Sıçanlara diyetle birlikte verilen E vitaminin üç ay sonunda AKK üzerine etkili olmadığı, ancak rotasyonel strese bağlı oluşan kemik yıkımına yatkın bölgelerde E vitamini uygulamasının koruyucu bir etki sağlayabileceği belirtilmiştir (Cohen ve Meyer 1993). Parrish ve ark (1977) ağızdan farklı dozlarda α-tokoferol asetat verilen sıçanlarda deneysel periodontitis oluşturmuşlar ve çalışma sonunda bu uygulamanın AKK üzerinde etkili olmadığını saptamışlardır. Bu çalışmada, kontrol grubu, insülin uygulanan ve uygulanmayan diyabet gruplarının tamamında deneysel periodontitis oluşturulmuş ve üç hafta süresince 40mg/kg α-tokoferol verilerek alveoler kemik üzerine etkisi histometrik olarak incelenmiştir. Ancak, hiçbir çalışma grubunda α-tokoferol'ün AKK üzerine bir etkisi tespit edilmemiştir. Alveoler kemik düzeyinin histometrik ölçümünde görüntü analiz sistemi kullanılmış ve mine-sement birleşimi ve alveoler kemik kreti arasında beş farklı bölgeden ölçüm yapılarak ortalaması alınmıştır. Ancak, literatürde diyabetik ve periodontitisli sıçanlarda yardımcı α-tokoferol tedavisinin alveoler kemik düzeyi üzerine etkisinin değerlendirildiği bir çalışma saptanamadığından elde edilen sonuçlar kıyaslanamamıştır. Bu araştırmanın sınırları içerisinde, üç haftalık α-tokoferol ve insülin uygulama süresinin alveoler kemik üzerinde olası etkilerinin tespitinde yeterli olmadığı düşünülmektedir. Ayrıca, ilaç dozu, çalışma metodu gibi parametrelerin de sonucu etkileyebileceği ileri sürülebilir.

4.3. Sitokinler

Sitokinler, hücreler arası etkileşimlerde mesaj iletici olarak görev yapan, çeşitli hücreler tarafından salgılanabilen, glikoprotein yapıdaki maddelerdir (Dinarello 2000). Hücre çoğalması, büyümesi, aktive edilmesi, enflamasyon ve tamir gibi durumlarda düzenleyici etkileri vardır (Wolf ve ark 2007). Özellikle dişetinde kollajen yıkımı, periodontal ataşman ve alveoler kemik kaybı ile birlikte dişeti ve/veya DOS'ta IL-1β, TNF-α, IL-6 gibi pro-enflamatuvar sitokinlerin düzeylerinde artış görülürken, IL-4 gibi anti-enflamatuvar sitokinlerin seviyelerinde azalma olduğu rapor edilmiştir (Stashenko ve ark 1991a, Stashenko ve ark 1991b, Dongari-Bagtzogluo ve Ebersole 1998, Ejeil ve ark 2003, Giannopoulou ve ark 2003b; Bastos ve ark 2009). Ayrıca, periodontal doku yıkımında bölgesel olarak artan sitokin

düzeylerinin sistemik olarak dolaşıma geçerek etkisini sürdürebileceği ileri sürülmektedir (Loos ve ark 2000, Górska ve ark 2003, Buhlin ve ark 2009). Periodontitisli hastaların plazma IL-6 (Loos ve ark 2000), serum IL-1β (Górska ve ark 2003) konsantrasyonlarının sağlıklı kontrollerden daha yüksek, plazma IL-4 (Buhlin ve ark 2009) düzeylerinin ise daha düşük düzeylerde olduğu bulunmuştur (Loos ve ark 2000).

Diyabetin nöropati, retinopati, nefropati, kardiyovasküler hastalık, perivasküler değişiklikler gibi komplikasyonlarının yanı sıra periodontitise de neden olabileceği ileri sürülmektedir (Borrell ve ark 2005, Campus ve ark 2005, King 2008). Enflamatuvar değişimler ile insülin direnci arasında çift yönlü bir ilişki olabileceği gösterilmiştir. Diyabetik nefropatinin kontrol altına alındığı olgularda pro-enflamatuvar bir sitokin olan IL-6'nın serum düzeylerinin azaldığı (Choudhary ve Ahlawat 2008), ancak hiperglisemik durumlarda IL-6'nın insülin sinyalini bozarak damar endotelinde NO üretimini arttırdığı belirtilmiştir (Andreozzi ve ark 2007). Literatürde periodontal doku yıkımı ve özellikle dokudaki sitokin dengesinin bozulmasıyla birlikte glukoz tolerasının bozulabileceği rapor edilmiştir (Engebretson ve ark 2004, Andersen ve ark 2006, Santos ve ark 2010). Özellikle hiperglisemiyle birlikte IL-1β'nın dişeti (Doxey ve ark 1998, Andersen ve ark 2006) ve DOS (Engebretson ve ark 2004, Salvi ve ark 2010, Andriankaja ve ark 2009) düzeylerinde artış veya değişim olmadığı (Correa ve ark 2008) ve DOS IL-4 (Santos ve ark 2010) seviyesinde azalma veya dişeti IL-4 düzeylerinin değişmediği (Shin ve ark 2010), IL-6'nın dişeti (Venza ve ark 2010) ve serum (Andriankaja ve ark 2009 konsantrasyonlarının yükseldiği saptanmıştır. Kontrolsüz diyabeti ve periodontitisi olan bireylerde glisemik kontrolün gerçekleşmesiyle birlikte serum IL-6 düzeylerinin azaldığı, ancak serum IL-1β ve IL-4 seviyelerinde önemli bir değişim olmadığı rapor edilmiştir (O'Connell ve ark 2008). Bu araştırmada kontrollü diyabet, kontrolsüz diyabet ve diyabetsiz deneysel periodontitis oluşturulmuş sıçanların serum IL-1β, IL-4 ve IL-6 konsantrasyonları değerlendirilmiş ve gruplar arasında önemli fark bulunmamıştır. Araştırma sonunda periodontitis varlığında kontrollü/kontrolsüz diyabetin serum sitokin düzeylerine etkisi bulunmamıştır. Elde edilen bu sonuçlar periodontitis ve diyabetin birlikte olduğu durumlarda serum sitokin düzeylerini araştıran bir çalışmaya ulaşılamadığından kıyaslanamamıştır.

Son yıllarda antioksidanların romatoid artrid ve pulmoner fibrozis gibi enflamatuvar değişimlerde IL-1β ve IL-6 gibi pro-enflamatuvar sitokin düzeylerinin baskılanması amacıyla kullanılabileceği gündeme gelmiştir (Venkatraman ve Chu 1999, Armutcu ve ark 2007). Önemli bir Vitamin E öncüsü olan α-tokoferol'ün sistemik olarak etkisi ile ilgili çelişkili sonuçlar vardır. Alfa-tokoferol'ün monosit (Vega-Lopez ve ark 2004), serum (Norazlina ve ark 2007) ve plazma (Devaraj ve ark 2008) IL-1β ve IL-6 düzeylerine bir etkisinin olmadığını rapor eden çalışmaların yanı sıra, lökosit (Tits ve ark 2000), beyin hücresi ve serum (Godbout ve ark 2004, Godbout ve ark 2005) seviyelerini baskıladığını gösteren çalışmalar da vardır. Literatürde diyabete bağlı dejeneratif değişimlerin tedavisine yardımcı olarak Vitamin E (Mol ve ark 1997) veya α-tokoferol (Devaraj ve Jialal 1999, Devaraj ve Jialal 2000a, Devaraj ve Jialal 2000b, Wu ve ark 2007) kullanımına olan ilgi artmıştır. Mol ve ark (1997)'nın araştırmasında sigara içen ve diyabetli bireylerde dört hafta boyunca 600 IU E vitamini uygulamışlar ve tedavinin plazma IL-1β düzeylerini etkilemediğini, ancak IL-1 reseptör antagonisti ve TNF-α seviyelerini baskıladığını saptamışlardır. Diyabet olan bireylerde yapılan çalışmalarda üç ay boyunca 1200 IU/gün α-tokoferol kullanımının monosit IL-1β ve IL-6 düzeylerini azalttığı rapor edilmiştir (Devaraj ve Jialal 2000a, Devaraj ve Jialal 2000b). Diğer taraftan altı hafta boyunca 500mg/gün α-tokoferol alan tip II diyabetik bireylerin plazma CRP, TNF-α ve IL-6 düzeylerinde bir fark olmadığı belirtilmiştir (Wu ve ark 2007). Bu çalışmada sıçanlarda streptozotosin ile Tip I diyabet ve deneysel periodontitis oluşturulmuş ve dejeneratif değişimlere bağlı artan sitokin düzeylerinin seruma geçebileceği hipotezinden yola çıkılarak, α-tokoferol'ün bu belirteçler üzerindeki olası etkileri araştırılmıştır. Ancak, çalışma sonunda insülin ve α-tokoferol'ün tek ve kombine kullanımlarının serum IL-1β, IL-6 ve IL-4 konsantrasyonları üzerine bir etkisi saptanmamıştır. Deneysel periodontitis oluşturulan kontrol grubunda da α-tokoferol'ün serum sitokin düzeyleri üzerine ilave bir etkisi gözlenmemiştir. Elde edilen bu sonucun ilaç dozu, enjeksiyonlar ve çalışma süresine bağlı olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, bu araştırmada dişeti dokusunda IL-1β, IL-6 ve IL-4 düzeylerinin tespit edilmemesi çalışmanın limitasyonlarındandır. Ancak, bilgilerimiz dahilinde diyabet ve/veya periodontitise bağlı doku yıkımlarında α-tokoferol'ün serum sitokin seviyeleri üzerine etkisinin değerlendirildiği bir araştırmaya ulaşılamamıştır.

4.4. iNOS

Nitrik oksit, moleküler, hücresel ve fizyolojik olayları etkileyen kısa ömürlü bir serbest radikaldir (Rizk ve ark 2004) ve nitrik oksit sentazlar adı verilen enzim ailesi ile L-arjininin tarafından sentezlenir. Nitrik oksitin üç formundan bir olan iNOS makrofajlarda bulunur (Grisham ve ark 1999, Chapple ve Matthews 2007). Vücutta görülen enflamatuvar değişimlerde iNOS artışının oldukça önemli bir belirteç olduğu bilinmektedir (Downey ve Elborn 2000, Dugo ve ark 2004). Diyabette insülin direncinin gelişmesinde kronik enflamasyonun ve özellikle iNOS'un önemi üzerinde durulmakta ve karşılıklı olarak birbirlerini etkiledikleri ileri sürülmektedir (Corbett ve ark 1993, Steinberg ve ark 1994). Corbett ve ark (1993) sitokine bağlı olarak azalan insülin üretiminde NO ürünlerinin baskılayıcı etkisi olduğunu göstermiştir. Diğer taraftan insülinin de endotel kaynaklı nitrik oksit mekanizmasını düzenlediği rapor edilmiştir (Steinberg ve ark 1994). Diyabette hiperglisemik durumla birlikte karaciğerde (Fujimoto ve ark 2005), kulağın içkısmı "cochlea" ve bu bölgedeki damarlarda (Liu ve ark 2008), kalpte miyokardiyum (Marfella ve ark 2004) ve kardiyomiyosit hücrelerinde (Soliman ve ark 2008) iNOS ekpresyonunun arttığı ve kardiyomiyopatide kalpteki kontraktil fonksiyonu azalttığı (Cheng ve ark 2004, Soliman ve ark 2008) ve endotelyal disfonksiyona (Nagareddy ve ark 2005) neden olduğu tespit edilmiştir.

Periodontal hastalık kronik enflamatuvar bir hastalıktır ve deneysel hayvan çalışmalarında ligatürle oluşturulan periodontitis modelinde dişeti iNOS düzeylerinin sağlıklı kontrollere göre daha yüksek düzeylerde olduğu tespit edilmiştir (Lohinai ve ark 1998, Lohinai ve ark 2001, Di Paola ve ark 2006, Muià ve ark 2006). Kesitsel çalışmalarda gingivitis (Hirose ve ark 2001, Batista ve ark 2002) ve kronik periodontitis (Batista ve ark 2002, Güllü ve ark 2005, Pan ve ark 2010) varlığında insan dişeti dokusu iNOS ekspresyonunun enflamasyona paralel olarak artış gösterdiği rapor edilmiştir. Ayrıca, insan dişeti fibroblastlarının TNF-α, IL-1β gibi pro-enflamatuvar sitokinlerin varlığında NO ve iNOS ekspresyonunun görüldüğü (Daghigh ve ark 2002) ve lokalize agresif periodontitis teşhisi konulmuş bireylerden elde edilen nötrofillerdeki NOS aktivitesinin sağlıklı bireylere göre daha yüksek olduğu (Shibata ve ark 2001) gösterilmiştir. Alloksan ile diyabet ve deneysel periodontitis oluşturulmuş sıçanlarda "radioligand" yöntemle iNOS aktivitesi

(Popkov ve ark 2005) ve metabolik kontrolün bozulduğu diyabetik bireylerde kronik periodontitis varlığında immünohistokimyasal analiz kullanılarak dişeti iNOS ekspresyonu (Pan ve ark 2010) incelenmiş, ve hastalık şiddeti ve enflamatuvar hücre yoğunluğuyla orantılı olarak iNOS düzeyinin artış gösterdiği rapor edilmiştir. Her iki araştırmada da periodontitis ve diyabetin birlikte görüldüğü durumdaki iNOS düzeyi, sadece periodontitisli gruptan biraz daha yüksek düzeyde saptanmış, ancak istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Araştırmalar arasında yöntemler farklı olmasına karşın birbirini destekleyen sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmada da benzer olarak kontrolsüz diyabet ve periodontitis olan gruptaki iNOS pozitif boyanan hücre sayısı sadece periodontitis olan gruptan daha fazla olma eğiliminde bulunmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Araştırmada iNOS ekspresyon düzeyi immünohistokimyasal yöntemle bakılmış ve görüntü analiz yöntemi kullanılarak 0,1 mm^2'deki pozitif boyanan hücre sayıları değerlendirilmiştir. Çalışmada elde edilen verilerin standart sapmaları bu eğilimin önemli bulunmamasının nedenlerinden biri olarak düşünülmektedir. Bu araştırmada, diğer çalışmadan farklı olarak ayrıca insülin uygulanan diyabetik grup oluşturulmuştur. Ancak, insülinin NOS ekspresyonunu arttırarak iskelet kasında damarlarda vazodilatasyonu sağladığı (Steinberg ve ark 1994) ve bir anti-hiperglisemik olan "rosiglitazon"un da periodontitiste dişeti iNOS düzeyini baskıladığı bildirilmesine karşın, bilgilerimiz dahilinde insülinin dişeti iNOS ekspresyonuna etkisini değerlendiren çalışmaya rastlanamamıştır. İnsülin uygulanan kontrollü diyabet grubundaki dişeti iNOS ekspresyonu, kontrolsüz diyabet grubuna göre daha düşük düzeyde olma eğiliminde tespit edilmiş, ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ayrıca, kontrollü diyabet ve diyabet olmayan gruplardaki dişeti iNOS düzeyleri benzer bulunmuştur. Bu araştırmanın sınırları içerisinde insülin tedavisinin dişeti iNOS ekspresyonunu düzenleyebileceği düşünülmekle birlikte, iNOS düzeylerini baskıladığına dair kesin sonuç elde edilememiştir.

Vitamin E'nin güçlü bir antioksidan olduğu ve hücre kültüründe astrositler ve mikroglia hücrelerinde yapılan çalışmada iNOS ekspresyonunu baskıladığı rapor edilmiştir (Ayasolla ve ark 2004). Alfa-tokoferol antioksidan ve anti-enflamatuvar özelliği olan önemli bir Vitamin E öncüsüdür. Özellikle sıçanlarda iskemi-reperfüzyona bağlı hasar oluşturulmuş böbrek (Gurel ve ark 2004) ve beyin (Hsiao ve ark 2007) dokularında, *Helicobacter pylori* enfeksiyonuna bağlı mide mukozası

hasarında (Oh ve ark 2005) ve lipopolisakkarit, IL-1β ve TNF-α ile uyarılmış alveoler makrofajlarda (Khanduja ve ark 2005) α-tokoferol'ün iNOS düzeyini azalttığı saptanmıştır.

Diyabetik bireylerde hiperglisemiyle birlikte pankreas gibi dokularda artan sitokin, NO, NOS düzeyi ve yıkımın (Størling ve ark 2005) baskılanması amacıyla antioksidan ve özelikle de Vitamin E kullanımıyla ilgili çalışmalar vardır, ancak sınırlı sayıdadır (Sjöholm ve ark 2000, Young ve ark 2004, Gonzàlez-Correa ve ark 2006, Tronchini ve ark 2010). Vitamin E'nin (Young ve ark 2004) ve α-tokoferol (Tronchini ve ark 2010)'ün diyabetik erkek sıçanlarda üreme organında artan nNOS düzeyini baskıladığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, Tip 1 diyabetik sıçanların beyin dokularında artan iNOS düzeylerinin α-tokoferol uygulamasıyla birlikte azaldığı rapor edilmiştir (Gonzàlez-Correa ve ark 2006). Ayrıca, IL-1β'nın NO vasıtasıyla insülin salgılayan hücrelerin fonksiyonlarını baskıladığı ve γ-tokoferol uygulamasının insülin salgılayan hücreleri NO'nun olumsuz etkilerinden koruduğu rapor edilmiştir (Sjöholm ve ark 2000).

Bu araştırmada, streptozotosin ile deneysel tip 1 diyabet oluşturulmuş ve 3/0 ipek sütur kullanılarak periodontal doku yıkımı elde edilmiştir. Kontrollü diyabet oluşturmak için günde iki kez 2U insülin verilmiştir. Deneysel periodontitisli kontrollü ve kontrolsüz diyabeti olan ve diyabet oluşturulmamış sıçanlara dişeti enflamasyonunu ve iNOS ekspresyonunu baskılamak amacıyla üç haftalık çalışma süresince günde bir kez 40mg/kg α-tokoferol verildi. Literatürde periodontitis (Muià ve ark 2006) ve diyabetik periodontitis (Popkov ve ark 2005) tedavisinde antioksidan kullanımıyla iNOS düzeylerinin azaldığı belirtilmesine karşın, periodontitis ve diyabetik periodontitis tedavisinde Vitamin E veya α-tokoferol'ün oksidatif mekanizmaya etkisini araştıran bir çalışmaya ulaşılamamıştır. Muià ve ark (2006) sıçanlarda deneysel periodontitis oluşturdukları ve sekiz gün süresince NF-κB'yi baskılayan bir antioksidan olan "pirolidin ditiokarbomat" uyguladıkları çalışmada, periodontitisle birlikte gingival dokularda artan TNF-α ve iNOS düzeylerinin azaldığını rapor etmişlerdir. Bu araştırmada, sadece deneysel periodontitis oluşturulan grupta α-tokoferol kullanımına bağlı dişeti iNOS ekspresyonunun serum fizyolojik verilen gruba göre önemli oranda baskılandığı bulunmuştur. Popkov ve ark (2005) deneysel diyabet oluşturdukları sıçanlara antioksidan olarak "mexidol"

uygulamışlar ve 14 gün sonra dişeti iNOS aktivitesinin azaldığını göstermişlerdir. Bu araştırmada da α-tokoferol verilen kontrolsüz ve kontrollü diyabetli sıçanlardaki dişeti iNOS ekspresyonunun serum fizyolojik uygulanan gruba göre azalmış olduğu saptandı. Böylece kontrollü ve kontrolsüz diyabet olan periodontitisli hastaların tedavisinde yardımcı olarak verilen α-tokoferol'ün iNOS ekspresyonunun baskılanmasında etkin olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmanın sınırları içerisinde α-tokoferol'ün oksidatif stresi azaltarak dişeti enflamasyonu ve doku yıkımını baskıladığı düşünülmektedir. Ayrıca, insülin tedavisi uygulanmayan ancak α-tokoferol verilen kontrolsüz diyabetik gruptaki dişeti iNOS düzeyinin diyabetsiz gruptaki seviyesinden önemli oranda daha fazla bulunması hipergliseminin periodontal doku yıkımındaki etkinliğini göstermektedir. Bu araştırmada α-tokoferol uygulanan hem insülin verilen kontrollü diyabetik hem de diyabetik olmayan sıçanların dişeti iNOS ekspresyonu benzer düzeyde saptandı. Ayrıca, kontrollü diyabet grubunda α-tokoferol'e bağlı baskılanan dişeti iNOS ekspresyonu kontrolsüz diyabette ilaç uygulanan gruptan daha düşük olma eğiliminde bulundu, ancak fark istatistiksel olarak önemsizdi. Elde edilen sonuçlara göre, diyabetin insülin tedavisiyle kontrol altına alınmasının ve ilave α-tokoferol verilmesinin periodontal doku yıkımının önlenmesinde yardımcı bir tedavi olabileceği düşünülebilir.

4.5. CD95

Programlı hücre ölümü olarak bilinen apoptozis, hücrelerin fizyolojik olarak uzaklaştırılmasında genetik olarak kontrol edilen bir sistemdir. Isıl şok stres proteinler, serbest radikaller, oksidatif stres, ultraviyole radyasyon gibi çeşitli etkenler, membran-bağlı ölüm reseptörlerini uyararak apoptozis mekanizmasının bozulmasına neden olabilir ve greft reddi, kanser, otoimmün diyabet, nörodejeneratif hasarlar gibi çeşitli problemler gelişebilir (Afford ve Randhawa 2000, Lawen 2003). Apoptozis "uyarılma ve reseptör ligand bağlanması", "hücre içi sinyalizasyon", "apoptozise bağlı morfolojik ve biyokimyasal değişimler" ve "apoptozise giden hücrelerin fagositozu" gibi aşamalarla ve karmaşık bir mekanizmayla gerçekleşmektedir. Apoptotik sinyalin yansıtılmasında önemli membran ölüm reseptörlerinden birisi de TNF süper ailesinin bir üyesi olan CD95 (Fas/APO-1)'tir (Afford ve Randhawa 2000, Timmer ve ark 2002, Lawen 2003, Loro ve ark 2005).

Diyabetin kontrol altına alınamaması ve hiperglisemi ile birlikte çeşitli dokularda görülen patolojik değişimlerde bozulan apoptozis mekanizmasının önemi üzerinde durulmaktadır (Herrman ve ark 1999, Hall ve ark 2000, Ido ve ark 2002, He ve ark 2004, Susztak ve ark 2006). Ancak, apoptozisin diyabetik komplikasyonlarla ilişkisi ile çelişkili çalışmalar rapor edilmiştir. Literatürde hiperglisemi sonucunda vasküler düz kas hücresinde (Hall ve ark 2000), hepatomegalide (Herrman ve ark 1999) ve koroner arter düz kas hücrelerinde (Sakuma ve ark 2002) apoptozisin azaldığı rapor edilmesine karşın, periferal kan lenfositlerinde (Otton ve ark 2004), insan umblikal ven endotelyal hücrelerinde (Ido ve ark 2002), osteoblastlarda (He ve ark 2004), kalp dokusunda (Ceriello ve ark 2002), kardiyomiyositlerde (Ghosh ve ark 2005), diyabetik nöropatide nöronlarda (Guo ve ark 2004) ve mitokondriyal disfonksiyon varlığında (Srinivasan ve ark 2000), nefropatide (Susztak ve ark 2006), retinal hücrelerde (Kusner ve ark 2004) ve pankreatik Langerhans adacıklarında (Federici ve ark 2001) apoptotik hücre ölümünün arttığı rapor edilmiştir.

Literatürde ketoasidoz görülen tip 1 diyabette insanlarda (Stassi ve ark 1997) ve deneysel hayvan çalışmalarında (Suarez-Pinzon ve ark 1999, Suarez-Pinzon ve ark 2000, Mellado-Gil ve Aguilar-Diosdado 2004, Choi ve ark 2009, Schumann ve ark 2007) pankreatik beta hücrelerinde CD95 membran reseptörünün önemi üzerinde durulmuş ve CD95 ölüm reseptörü ilişkili apoptoziste artış olduğu rapor edilmiştir. Böylece azalan CD95 ekspresyonu durumunda pankreas β hücrelerinden insülin üretim ve salgılanmasının sağlanabildiği sonucuna varılmıştır (Choi ve ark 2009). Ayrıca, diyabete bağlı retinal yıkımlarda lökosit-aracılıklı endotelyal hücre ölümü ve kan-retinal bariyer yıkımında (Joussen ve ark 2009), miyokard dokusunda (Zhang ve ark 2010) ve kardiyak miyositlerde (Wu ve ark 2008) CD95 ilişkili apoptotik hücre ölümünün arttığı, hatta böbrek fonksiyon bozukluğu olan bireylerde serumdaki düzeylerinin de yıkımla ilişkili olduğu (Niewczas ve ark 2009) bildirilmiştir.

Enflamatuvar doku yıkımlarında apoptotik mekanizmadaki değişimlerin rolü olduğu, ilaca bağlı dişeti büyümelerinde apoptotik hücre ölümünün azaldığı (Shimizu ve ark 2002, Bulut ve ark 2005) ya da değişmediği (Alaaddinoğlu ve ark 2005), periodontitiste apoptotik hücre ölümünde dengenin bozulduğu (Crawford ve ark 2000, Berker ve ark 2005, Jarnbring ve ark 2002, Noxon ve ark 2001) rapor edilmiştir. Dişeti oluğu sıvısındaki nötrofil ölümünün apoptozisden ziyade nekrozla

gerçekleştiği (Crawford ve ark 2000), kronik periodontitiste DOS nötrofillerinde gecikmiş apoptozis görüldüğü (Gamonal ve ark 2003) ve periferal nötrofillerde hücrenin apoptozisine bağlı monositlerin uyarılarak anti-enflamatuvar sitokin salgıladığı saptanmıştır (Berker ve ark 2005). Periodontitiste yıkımla birlikte dişetinde apoptotik keratinositlerin (Jarnbring ve ark 2002) arttığı, *P. gingivalis*'in uyardığı fibroblastlarda (Desta ve ark 2007) ve ortodontik apareye bağlı kemik yıkımında kemik hücrelerinde apoptotik hücre ölümünün önemli olduğu (Noxon ve ark 2001) gösterilmiştir. Gamonal ve ark (2001) periodontitiste insan dişeti CD95 pozitif hücre sayısının sağlıklı kontrollere kıyasla daha fazla olduğunu rapor etmişlerdir. Literatürde diyabetle birlikte periodontitis varlığında apoptozis mekanizmasının değerlendirildiği sınırlı sayıda çalışma vardır. Tunalı (2005) tez çalışmasında diyabetin tek başına dişeti dokularındaki apoptozisi baskıladığı, ancak deneysel diyabetle birlikte oluşturulan deneysel periodontitiste bağdoku ve dişeti epitelinde apoptozisin arttığını rapor etmiştir. Böylece diyabetin periodontal dokulardaki yapım/yıkım dengesini etkileyerek doku kaybını arttırabileceği belirtilmiştir. Ayrıca, O'Connell ve ark (2008) periodontitisli ve kontrolsüz diyabetik bireylerde serumda çözünebilen Fas düzeylerini araştırmışlar ve diyabetin kontrol altına alınmaya başlanmasıyla birlikte serum Fas konsantrasyonunun azaldığını saptamışlardır. Bu çalışmada deneysel periodontitisli ve insülin verilmeyen hiperglisemik, insülin verilerek kontrollü diyabeti olan ve diyabeti olmayan sıçanlarda, dişetinde apoptozisi arttıran bir yüzey reseptörü olan CD95 düzeyleri incelenmiştir. Üç haftalık deneysel süreç sonunda en fazla CD95 pozitif boyanan hücre sayısı kontrolsüz diyabet grubunda tespit edilmiştir. Bu fark deneysel periodontitisli Grup IA'dan ve kontrollü diyabeti olan Grup IIIA'dan önemli oranda yüksek düzeyde saptanmıştır. İnsülin kullanılan sıçanlardaki dişeti CD95 düzeyleri, diyabet olmayan grupla benzer bulundu. Bu araştırmanın sınırları içerisinde, diyabete bağlı olarak periodontal doku yıkımındaki artışta CD95 membran ölüm reseptörünün önemli rol aldığı ve insülin tedavisinin bu mekanizmanın baskılanmasında etkin olduğu düşünülmektedir. Bilgilerimiz dahilinde, diyabet ile birlikte periodontal doku yıkımında dişeti CD95 ekspresyonunu araştıran bir çalışmaya ulaşılamamıştır.

Vitamin E öncüsü olan α-tokoferol, toksik ya da karsinojenik etkiye bağlı oluşan oksidatif hasarın önlenmesinde etkin lipidle çözünebilen ve bağışıklık sistemi üzerinde önemli etkisi olan bir antioksidandır (Singh ve Jialal 2004, Schneider 2005).

Vitamin E'nin apoptotik hücre ölümüne etkisini sıçan mesanesi (Ludwig ve ark 2010), damarlar (Li ve ark 2004), lökosit, karaciğer ve böbrek dokuları (Ramanathan ve ark 2005) gibi vücutta farklı doku ve hücrelerde (Li-Weber ve ark 2002) değerlendiren çalışmalar vardır. Vitamin E'nin kaspaz-3'ü (Ludwig ve ark 2010), apoptotik ssDNA ve matriks metalloproteinaz-3'ü (Li ve ark 2004), ve Bcl-2, TNF-α'yı (Ramanathan ve ark 2005) baskılayarak apoptotik hücre ölümünü önlediği ve enflamasyonu azalttığı gösterilmiştir. Li-Weber ve ark (2002) Vitamin E'nin NF-κB ve AP-1'nın aktivasyonunu azaltarak periferal T hücrelerinde CD95-aracılıklı apoptozisi baskılandığını rapor etmişlerdir.

Diyabete bağlı olarak bozulan glisemik duruma bağlı apoptotik hücre ölümü ve çeşitli dokularda dejenerasyonlar görülmesine karşın, bu mekanizma üzerinde etkili olduğu düşünülen Vitamin E ile ilgili bir çalışma tespit edilmiştir. Shirpoor ve ark (2009) diyabetik sıçanlarda 300mg/gün E vitamini uygulamasının oksidatif stresle birlikte kardiyomiyositlerdeki apoptozisi azalttığını saptamışlardır. Bilgilerimiz dahilinde Vitamin E/α-tokoferol'ün diyabet ve/veya periodontitis varlığında dişetinde apoptotik mekanizmaya etkisini araştıran çalışmaya ulaşılamamıştır. Bu çalışmada, deneysel periodontitisli ve kontrollü diyabet olan/olmayan ya da diyabetsiz sıçanlarda α-tokoferol'ün CD95 aracılıklı apoptozisi baskıladığı sonucu elde edilmiştir. Üç haftalık değerlendirme sonunda α-tokoferol kullanan çalışma grupları kıyaslandığında, insülin kullanmayan kontrolsüz diyabet grubunun dişeti CD95 pozitif hücre sayısı, insülin kullanan kontrollü diyabet grubu ve sadece deneysel periodontitisli diyabetsiz gruptan daha fazla bulundu. Ancak, α-tokoferol'ün kullanıldığı ve glisemik kontrolün olmadığı gruptaki apoptotik hücre ölümü, serum fizyolojik verilen diyabetsiz/iyi kontrollü diyabet gruplarına benzerdi. Bu araştırmanın sınırları içerisinde α-tokoferol'ün CD95 aracılıklı apoptotik hücre ölümünü baskılamada etkinliği olduğu, hatta insülin kullanmayan grupta bile bu etkinin önemli olduğu sonucuna varıldı.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

5.1. İnsülin Tedavisi

AKK ve serum sitokin konsantrasyonları

1) Araştırmada deneysel diyabet ve periodontitis oluşturulmuş sıçanlara üç haftalık çalışma süresince insülin tedavisi uygulanmasına karşın glisemik kontrolün AKK ve serum sitokin konsantrasyonları üzerine ek bir katkısı tespit edilmedi.

Dişeti iNOS pozitif hücre sayısı

1) İnsülin tedavisi uygulanan glisemik kontrolün (Grup IIIA) olduğu gruptaki dişeti iNOS değerleri kontrolsüz diyabeti (Grup IIA) olan sıçanlardan daha düşük olma eğilimindeydi, ancak fark istatistiksel olarak önemli bulunmadı.

Dişeti CD95 pozitif hücre sayısı

1) İnsülin uygulaması yapılan sıçanların dişeti CD95 pozitif boyanan hücre sayısının diyabet olmayan sıçanlara benzer düzeylerde olduğu ve glisemik kontrolü olmayan (Grup IIA) gruptan da önemli oranda daha düşük olduğu tespit edildi.

2) Bu çalışmada, en fazla dişeti CD95 pozitif boyanan hücre sayısı glisemik kontrolü olmayan (Grup IIA) grupta gözlendi. Bu veriler kontrol (Grup IA) ve insülin verilen (Grup IIIA) gruplardan önemli oranda yüksek bulundu.

5.2. Alfa-tokoferol Uygulaması

AKK ve serum sitokin konsantrasyonları

1) Çalışmada kontrol grubu (Grup I), insülin verilmeyen (Grup II) ve insülin verilen (Grup III) gruplarda α-tokoferol (40 mg/kg) uygulamasının AKK ve serum sitokin düzeyleri üzerine ilave bir etkisi olmadığı ve hem grup içi hem de gruplar arası ölçümlerin farklılık göstermediği tespit edildi.

Dişeti iNOS pozitif hücre sayısı

1) Alfa-tokoferol uygulamasının tüm gruplarda dişeti iNOS ekspresyonunu baskıladığı ve grup içi değerlendirmelerde dişeti iNOS pozitif hücre sayısının α-tokoferol verilmeyen örneklerden önemli oranda daha düşük olduğu saptandı.

2) Alfa-tokoferol verilen tüm gruplar kıyaslandığında kontrol grubu (Grup IB)'ndaki dişeti iNOS ekspresyonu insülin uygulanmayan (Grup IIB) gruptan daha düşük düzeyde bulundu.

3) En yüksek iNOS düzeyi insülin uygulanmayan (Grup IIB) grupta tespit edilmesine karşın insülin uygulanan gruptan (Grup IIIB) önemli oranda farklı bulunmadı.

4) Alfa-tokoferol kullanılan ancak glisemik kontrolün olmadığı gruptaki (Grup IIB) dişeti iNOS pozitif hücre sayısı, sadece serum fizyolojik verilen kontrol grubu (Grup IA) ve insülin verilen (Grup IIIA) gruplardaki değerlere benzer düzeyde olduğu tespit edildi.

Dişeti CD95 pozitif hücre sayısı

1)Alfa-tokoferol'ün dişeti CD95 ekspresyonu üzerine etkinliği değerlendirildiğinde, tüm çalışma gruplarında grup içi kıyaslamalarda serum fizyolojik uygulamalarına göre CD95 pozitif hücre sayısında önemli oranda azalma saptandı.

2) Alfa-tokoferol'ün uygulandığı gruplar karşılaştırıldığında kontrol (Grup IB) ve insülin kullanılan (Grup IIIB) gruplarındaki dişeti CD95 ekspresyonu benzerdi ve α-tokoferol'ün insülinin etkinliğini arttırdığı bulundu. En yüksek dişeti CD95 pozitif hücre sayısı insülin uygulanmayan kontrolsüz diyabet grubunda (Grup IIB) tespit edildi.

3) Alfa-tokoferol kullanılan ancak glisemik kontrolün olmadığı gruptaki (Grup IIB) dişeti CD95 ekspresyonu, sadece serum fizyolojik verilen kontrol grubu (Grup IA) ve insülin verilen (Grup IIIA) gruplardaki değerlere benzer düzeyde olduğu tespit edildi.

Diyabet ve periodontitis gibi patogenezleri benzerlik gösteren, gelişmelerinde birçok faktörün rol oynadığı, immunolojik ve genetik bazı ortak noktalar bulunan doku yıkımı ile karakterize hastalıklarda enflamatuvar bir belirteç olan sitokin düzeylerinin değişiklik gösterdiği belirtilmiştir (Engebretson ve ark 2004, Andersen ve ark 2006, Santos ve ark 2010). Diyabet ve/veya periodontitis durumunda dokularda artan ROT düzeyleriyle birlikte NO ve apoptotik hücre ölümünde bir artış olduğu tespit edilmiştir (Gamonal ve ark 2001, Lohinai ve ark 2001, Susztak ve ark 2006, Pan ve ark 2010). Bu çalışma diyabet ve periodontitis varlığında oksidatif hasarla birlikte dokuda enflamatuvar değişimlerin olduğu, sitokin düzeylerindeki değişimle birlikte NO, iNOS düzeyinde artış olduğu ve bu değişimlerden apoptotik hücre ölümünün etkilenebileceği hipotezinden yola çıkılarak bu yıkımın önlenmesinde α-tokoferol'ün etkisinin araştırılması üzerine kurulmuştur. Diyabette ve periodontitis durumunda α-tokoferol gibi antioksidanların kullanımıyla, NO gibi ROT'lerin etkilerine bağlı gelişen oksidatif stres ve doku yıkımının baskılanabileceği ve insülinin olumlu etkilerinin ve aktivitesini arttırılabileceği (Paolisso ve ark 1993, Jain ve ark 2000, Ihara ve ark 2000, Popkov ve ark 2005, Muià ve ark 2006) planlandı. Ayrıca, sitokinler tarafından uyarılan NO yoluyla apoptozis artışının E vitamini kullanımıyla baskılanabileceği (Sjöholm ve ark 2000) düşünüldü. Bu çalışmada α-tokoferol'ün kontrollü/kontrolsüz diyabet ve periodontitis ve sadece periodontitis durumlarında dişeti CD95 ve iNOS düzeyleri üzerinde baskılayıcı etkisinin olduğu bulundu. Özellikle insülin ile birlikte α-tokoferol uygulamasının ilacın etkinliğini arttırdığı ve dişeti iNOS ve CD95 ekspresyonunun serum fizyolojik verilen tüm gruplara göre daha fazla baskıladığı görüldü. Hatta glisemik kontrolün olmadığı koşullarda sadece α-tokoferol uygulamasının dişeti iNOS ve CD95 düzeylerine etkisi sadece insülin uygulanan gruba yakın değerlerde bulundu. Ancak öngörülen sitokin değişimleri serum değerlerine yansımadı. Bu araştırmada dişeti dokusundaki sitokin düzeyleri belirlenmediğinden lokal yıkıma olan etkisi tespit edilmemiştir. Ayrıca, AKK miktarlarında da gruplar arası fark gözlenmemekle birlikte, ilave ilaç kullanımının etkinliğinin değerlendirilmesinde daha uzun çalışma sürelerine ihtiyaç olduğu düşünülebilir. Gelecekte kontrollü, kontrolsüz diyabet ve periodontitis varlığında α-tokoferol'ün dişeti ve serumdaki sitokin değerleri üzerindeki etkilerini belirleyebilmek, AKK değişimlerini farklı çalışma sürelerinde gözlemlemek, ayrıca α-tokoferol uygulamasıyla birlikte iNOS ve CD95 ekspresyon

düzeylerinin farklı çalışma ve zaman aralıklarındaki değişimlerini değerlendirebilmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

6.ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Streptozotosin ile Diyabet Oluşturulmuş Deneysel Periodontitisli Sıçanlarda İnsülin ve Alfa-Tokoferol Tedavisinin Serum Sitokin Düzeyleri ve Dişeti iNOS ve CD95 Ekspresyonu Üzerine Etkileri

Mükerrem Hatipoğlu

Periodontoloji Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2011

Bu araştırmanın amacı, deneysel periodontitis ve streptozotosin (STZ) ile diyabet oluşturulan/oluşturulmayan sıçanlarda α-tokoferol ve/veya insülin'in alveoler kemik kaybı, dişeti iNOS ve CD95 + hücre sayılarına etkilerini araştırmaktır.

Toplam 60 adet Sprague Dawley sıçan üç gruba ayrıldı: Grup I: Diyabetsiz grup, Grup II: STZ ile diyabet oluşturulan grup, Grup III: STZ ile diyabet oluşturulan ve insülin terapisi verilen grup (4 U/gün). Tüm hayvanlara anestezi yapıldı ve 3/0 ipek sütur mandibular alt molar dişlerin çevresine yerleştirildi. Tüm gruplar serum fizyolojik (Grup IA, Grup IIA, Grup IIIA) ve α-tokoferol (40mg/kg/gün) enjekte edilen gruplara (Grup IB, Grup IIB, Grup IIIB) ayrıldı. Üç haftalık süre sonunda tüm sıçanlar kurban edildi ve dokular histometrik ve immünohistokimyasal ölçümler için nötral tamponlanmış %10'luk formaldehit solüsyonunda sabitlendi. Alveoler kemik kaybı (AKK), dişeti iNOS+ ve CD95+ hücre sayıları görüntü analiz programı kullanılarak analiz edildi. Serum IL-1β, IL-4 ve IL-6 konsantrasyonları ticari ELISA kitleri kullanılarak ölçüldü. İstatistiksel kıyaslamalar için iki-yönlü varyans analizi, tek-yönlü varyans analizi ve Tukey HSD kullanıldı $p<0,05$ anlamlılık düzeyi kabul edildi.

Çalışmanın sonunda gruplar arasında AKK ve serum sitokin konsantrasyonları farklı bulunmadı ($p>0,05$). Alfa-tokoferol uygulaması Grup IB, Grup IIB ve Grup IIIB'deki dişeti iNOS+ ve CD95+ hücre sayılarını, serum fizyolojik (Grup IB, Grup IIB ve Grup IIIB) gruplarına kıyasla baskıladı ($p<0,05$). Grup IIA'daki sıçanlar Grup IA ve Grup IIIA'ya göre daha fazla düzeyde iNOS+ ve CD95+ hücre sayısı gösterdi ($p<0,05$). Grup IB ve Grup IIIB'deki dişeti iNOS+ ve CD95+ hücre sayıları benzer bulundu ($p>0,05$).

Bu araştırmanın sınırları içerisinde, α-tokoferol'ün deneysel periodontitis oluşturulmuş STZ ile diyabet oluşturulmuş/oluşturulmamış sıçanlarda dişetindeki oksidatif hasarı ve apoptotik hücre ölümünü azalttığı ve ayrıca insülinin etkinliğini arttırdığı ileri sürülebilir.

Anahtar kelimeler: Alfa-tokoferol; CD95; iNOS; diyabet; deneysel periodontitis.

7. SUMMARY

The Effects of Insulin and Alpha-tocopherol Therapy on Serum Cytokine Levels and iNOS and CD95 Expression on Gingival Tissues of Rats with Experimental Periodontitis and Streptozotocin-Induced Diabetes

The aim of this study was to investigate the effects of α-tocopherol and/or insulin administration on alveolar bone loss, number of inductible nitric oxide synthase (iNOS)+, CD95+ cells in gingival tissues and serum cytokine concentrations in rats with experimental periodontitis with/without streptozotocin (STZ)-induced diabetes.

Sixty male Sprague Dawley rats were divided into three groups: Group I: non-diabetic group, Group II: STZ-induced type I diabetes, Group III: STZ induced type I diabetes and insulin therapy (4 U/day). All animals were anesthetized, and 3/0 silk sutures were placed at the gingival margin level of the mandibular right first molars. All groups divided into two subgroups; thirty rats was injected with saline (Group IA, Group IIA, Group IIIA) and other thirty rats (Group IB, Group IIB, Group IIIB) was injected with α-tocopherol (40mg/kg/day). After 3 weeks, all rats were sacrified and the tissues were fixed using neutral buffered %10 formaldehyde solution for histometrical and immunohistochemical investigation. Alveolar bone loss (ABL), number of iNOS+ and CD95+ cells in gingival tissues were analyzed by using image analysis program. The concentrations of serum IL-1β, IL-4 and IL-6 levels were measured by using commercial ELISA kits. Statistical comparisons were performed by using two-way analysis of variance, one way analysis of variance and Tukey HSD, with significance set at $p<0,05$.

At the end of the study, there were no statistically significant differences in ABL and serum cytokine concentrations between the study groups ($p>0,05$). Administration of α-tocopherol were suppressed number of iNOS and CD95+ cells in gingival tissues in Group IB, Group IIB, Group IIIB rats, compared to saline groups (Group IA, Group IIA, Group IIIA) ($p<0,05$). Rats from group IIA showed significantly higher levels in number of iNOS+ and CD95+ cells compared with rats from Group IA and Group IIIA ($p<0,05$). The number of iNOS and CD95+ cells in gingival tissues were similar levels in Group IB and group IIIB ($p<0,05$).

Within the limits of this study, it can be suggested that α-tocopherol decreases oxidative damage and apoptotic cell death in gingival tissues of rats with experimental periodontitis with/without STZ-induced diabetes and also improves the action of insulin.

Key Words: Alpha-tocopherol; CD95; iNOS; diabetes; experimental periodontitis.

8. KAYNAKLAR

1. Abbott CA, Carington AL, Ashe H, Bath S, Every LC, Griffiths J, Hann AW, Hussein A, Jacson N, Johnson KE, Ryder CH, Torkington R, Van Ross ERE, Whalley AM, Widdows P, Williamson S, Boultont AJM. The North- West diabetes foot care study: incidence of, and risk factors for, new diabetic foot ulseration in a community-based patient cohort. Diabetic Medicine. 2002; 19: 377-384.

2. Abdel Hamid MA, Moeman LA, El-Sergani T, Labib HM. Serum levels of interleukin–12 and TNF- Alpha predict non proliferative diabetic retinopaty in type–1 diabetic patients. Research Journal of Medicine and Medical Sciences. 2009; 4: 340-344.

3. Abramson SB, Amin AR, Clancy RM, Attur M. The Role of nitric oxide in tissue destruction. Best Practice & Research Clinical Rheumatology. 2001; 15: 831-845.

4. Abou Sulaiman AE, Shehadeh RMH. Assessment of total antioxidant capacity and the use of vitamin C in the treatment of non-smokers with chronic periodontitis. J Periodontol. 2010; 81: 1547-1554.

5. Afford S, Randhawa S. Apoptosis. J Clin Pathol: Mol Pathol. 2000; 53: 55-63.

6. Ahmad NS, Khalid BAK, Luke DA, Nirwana SI. Tocotrienol offers beter protection than tocopherol from free radical-induced damage of rat bone. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology. 2005;32: 761-770.

7. Aigner T. Apoptosis, necrosis, or whatever: how to find out what really happens? J Pathol. 2002; 198: 1-4.

8. Akaike T. Role of free radicals in viral pathogenesis and mutation. Rev. Med. Virol. 2001; 11: 87-101.

9. Akalin FA, Toklu E, Renda N: Analysis of superoxide dismutase activity levels in gingiva and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis and periodontally healthy controls. J Clin Peridontol. 2005; 32: 238-243.

10. Aksünger A, Akbatur HH, Or M, Güven D, Okur H, Hasanreisoğlu B. İlerlemiş proliferatif diabetik retinopati etyyopatogenezinde interlökin-8'in rolü. Ret-vit. 1994; 2: 63-66.

11. Alaaddinoğlu EE, Karabay G, Bulut S, Oduncuoğlu FB, Özdemir H, Bulut ÖE, Çolak T. Apoptosis in cyclosporin A-induced gingival overgrowth: A histological study. J Periodontol. 2005; 76: 166-170.

12. Allen RT, Hunter WJ, Agrawal DK. Morphological and Biochemical Characterization and Analysis of Apoptosis. JPM. 1997; 37: 215-228.

13. Al Shamsi M, Amin A, Adeghate E. Effect of vitamin C on liver and kidney functions in normal and diabetic rats. Annals New York Academy of Sciences. 2006; 1084: 371-390.

14. Alexandraki K, Piperi C, Kalofoutis C, Singh J, Alaveras A, Kalofoutis A. inflammatory process in type 2 diabetes the role of cytokines. Annals New York Academy of Science. 2006; 1084: 89-117.

15. Alikhani M, MacLellan CM, Raptis M, Vora S, Trackman PC, Graves DT. Advanced glycation end products induce apoptosis in fibroblasts through activation of ROS, MAP kinases, and the FOXO1 transcription factor. Am J Physiol Cell Physiol. 2007; 292: 850-856.

16. Almasan A, Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL: apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy. Cytokine & Growth Factor Reviews. 2003; 14: 337-348.

17.Al-Mubarak S, Ciancio S, Aljada A, Awa H, Hamouda W, Ghanim H, Zambon J, Boardman TJ, Mohanty P, Ross C, Dandona P. Comparative evaluation of adjunctive oral irrigation in diabetics. J Clin Periodontol. 2002; 29: 295-300.

18.Amarasena N, Ogawa H, Yoshihara A, Hanada N, Miyazaki H. Serum vitamin C- periodontal relationship in community-dwelling elderly Japanese. J Clin Periodontol. 2005; 32: 93-97.

19. American Academy of Periodontology. Diabetes and periodontal diseases. 2000; 71: 664-678.

20. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes care. 2004; 27: 5-10.

21. Andersen AR, Christiansen JS, Andersen JK, Kreiner S, Deckert T. Diabetic nephropathy in type 1 (Insulin-Dependent) diabetes: An epidemiological study. Diabetologia. 1983; 25: 496-501.

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

23. Andersen CCP, Flyvbjerg A, Buschard K, Stoltze K, Holmstrupt P. Relationship between periodontitis and diabetes: Lessons from rodent studies. J Periodontol. 2007; 78: 1264-1275.

24. Andersen CCP, Stoltze K, Holmstrupt P, Buschard K, Flyvbjerg A. Renal alterations in prediabetic rats with periodontitis. J Periodontol. 2008; 79: 684-690.

25. Andreozzi F, Laratta E, Procopio C, Hribal MA, Sciacqua A, Perticone M, Miele C, Perticone F, Sesti G. İnterleukin-6 impairs the insulin signaling pathway, promoting production of nitric oxide in human umbilical vein endothelial cells. Molecular and Cellular Biology. 2007; 27: 2372-2383.

26. Andriankaja OM, Barros SP, Moss K, Panagakos FS, DeVizio W, J. Beck J, Offenbacher S. Levels of serum interleukin (IL-6) and gingival crevicular fluid of IL-1β and prostaglandin E2 among non-smoking subjects with gingivitis and Type 2 diabetes. J Periodontol. 2009; 80: 307-316.

27. Anovazzi G, Kim YJ, Viana AC, Curtis KMC, Orrico SRP, Cirelli JA, Scarel-Caminaga RM. Polymorphisms and haplotypes in the interleukin-4 gene are associated with chronic periodontitis in a brazilian population. J Periodontol. 2010; 81:392-402.

28. Araki E, Nishikawa T. Oxidative stress: A cause and therapeutic target of diabetic complications Journal of Diabetes Investigation. 2010; 1: 90-96.

29. Aren G, Sepet E, Özdemir D, Dinççağ N, Güvener B, Firatli E. Periodontal health, salivary status, and metabolik control in children with type 1 diabetes mellitus. J Periodontol. 2003; 74: 1789-1795.

30. Arend WP, Palmer G, Gabay C. IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. Immunological Reviews. 2008; 223: 20-38.

31. Armutcu F, Cabuk M, Gurel A, Atmaca H, Kart L. Caffeic acid phenethyl ester and vitamin E moderates IL-1β and IL-6 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. Pesticide Biochemistry and Physiology. 2007; 88: 209-212.

32. Arstall MA, Sawyer DB, Fukazawa R, Kelly RA. Cytokine-Mediated apoptosis in cardiac myocytes: The role of inducible nitric oxide synthase induction and peroxynitrite generation. Circ Res. 1999; 85: 829-840.

33. Asman B, Wijkander P, Hjerpe A. Reduction of collagen degradation in experimental granulation tissue by vitamin E and selenium. J Clin Periodontol. 1994; 21: 45-47.

34. Astley S, Langrish-Smith A, Southon S, Sampson M. Vitamin E supplementation and oxidative damage to DNA and plasma LDL in type 1 diabetes. Diabetes Care. 1999; 22: 1626-1631.

35. Aurer A, Aleksić J, Ivić -Kardum M, Aurer J, Čulo F: Nitric oxide synthesis is decreased in periodontitis. J Clin Periodontol. 2001; 28: 565-568.

36. Ayasolla K, Khan M, Singh AK, Singh I. Inflammatory mediator and h-amyloid (25-35)-induced ceramide generation and iNOS expression are inhibited by vitamin E. Free Radical Biology & Medicine. 2004; 37: 325-338.

37. Babel N, Cherepnev G, Babel D, Tropmann A, Hammer M, Volk H-D, Reinke P. Analysis of tumor necrosis factor-α, transforming growth factor-β, interleukin-10, IL-6, and interferon-γ gene polymorphisms in patients with chronic periodontitis. J Periodontol. 2006; 77: 1978-1983.

38. Balakirev MY, Khramtsov VV, Zimmer G. Modulation of the mitochondrial permeability transition by nitric oxide. Eur J Biochem. 1997; 246: 710-718.

39. Balligand J-L, Ungureanu-Longrois D, Simmons WW, Pimental D, Malinskin TA, Kapturczakn M, Ziad Tahan Z, Lowensteinll CJ, Davido AJ, Kelly RA, Smith TW, Michel T. Cytokine-inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in cardiac myocytes. The journal of biological chemistry. 1994; 269: 27580-27588.

40. Bastos MF, Lima JA, Vieira PM, Mestnik MJ, Faveri M, Duarte PM. TNF-α and IL-4 levels in generalized aggressive periodontitis subjects. Oral Diseases. 2009; 15: 82-87.

41. Batista AC, Silva TA, Chun JH, Lara VS. Nitric oxide synthesis and severity of human periodontal disease. Oral Diseases. 2002; 8: 254-260.

42. Baydas G, Canatan H, Turkoglu A. comparative analysis of the projective effects of melatonin and vitamin E on streptozocin-induced diabetes mellitus. J. Pineal Res. 2002; 32: 225-230.

43. Begum AN, Terao J. Projective effect of α-tocotrienol against free radical-induced impairment of erythrocyte deformability. Biosci Biotechnol Biochem. 2002; 66: 398-403.

44. Behle JH, Sedaghatfar MH, Demmer RT, Wolf DL, Celenti R, Kebschull M, Belusko PB, Herrera-Abreu M, Lalla E, Papapanou PN. Heterogeneity of systemic inflammatory responses to periodontal therapy. J Clin Periodontol. 2009; 36: 287-294.

45. Benguigui C, Bongard V, Ruidavets J-B, Chamontin B, Sixou M, FerriEres J, Amar J. Metabolic syndrome, insulin resistance and periodontitis: a cross- sectional study in a middle-aged French population. J Clin Periodontol. 2010; 37: 601-608.

46. Berker E, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Effect of neutrophil apoptosis on monocytic cytokine response to *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. J Periodontol. 2005; 6: 64-971.

47. Bernimoulin J-P. Recent concepts in plaque formation. J Clin Periodontol. 2003; 30: 7-9.

48. Bezerra MM, de Lima V, Alencar VBM, Vieira IB, Brito GAC, Ribeiro RA and Rocha FAC. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. J Periodontol. 2000; 71: 1009-101.

49. Bhatt NM, Barua S, Gupta S. Protective effect of *Enicostemma littorale* blume on rat model of diabetic neuropathy. American Journal of Infectious Diseases. 2009; 5: 99-105.

50. Birringer M, EyTina JH, Salvatore BA, Neuzil J. Vitamin E analogues as inducers of apoptosis: structure–function relation. British Journal of Cancer. 2003; 88: 1948-1955.

51. Blazhev A, Nicoloff G, Petrova C, Jordanova-Laleva P. Serum levels of interleukin 12 and interleukin 18 in diabetıc children. Diabetologia Croatica. 2006; 35: 3-6.

52. Bloomgarden ZT. Diabetes Complications. Diabetes Care. 2004; 27:1506-1514.

53. Bloomgarden ZT. Inflammation, atherosclerosis, and aspects of insulin action. Diabetes Care. 2005; 28: 2312-2319.

54. Bogdan C, Vodovotz Y, Paik J, Xie Q-w, Nathan C. Mechanism of suppression of nitric oxide synthase expression by interleukin-4 in primary mouse macrophages. J Leukoc Biol. 1994; 55: 227-233.

55. Bold RJ, Termuhlen PM, McConkey DJ. Apoptosis, cancer and cancer therapy. Surgical Oncology. 1997; 6: 133-142.

56. Borrell LN, Papapanou PN. Analytical epidemiology of periodontitis. J Clin Periodontol. 2005; 32: 132-158.

57. Bozkurt FY, Berker E, Akkuş S, Bulut Ş. Relationship between interleukin-6 levels in gingival crevicular fluid and Periodontal status in patients with rheumatoid arthritis and adult periodontitis. J Periodontol. 2000; 71: 1756-1760.

58. Brock GR, Butterworth CJ, Matthews JB, Chapple ILC. Local and systemic total antioxidant capacity in periodontitis and health. J Clin Periodontol. 2004; 31: 515-521.

59. Brüne B, Von Knethen A, Sandau KB. Nitric oxide and its role in apoptosis. European Journal of Pharmacology. 1998; 351: 261-272.

60. Buhlin K, Hultin M, Norderyd O, Persson L, Pockley AG, Klinge B, Gustafsson A. Risk factors for atherosclerosis in cases with severe periodontitis. J Clin Periodontol. 2009; 36: 541-549.

61. Bulut Ş, Özdemir BH, Alaaddinoğlu EE, Oduncuoğlu FB, Bulut ÖE, Demirhan B. Effect of Cyclosporin A on Apoptosis and Expression of p53 and bcl-2 Proteins in the Gingiva of Renal Transplant Patients. J Periodontol. 2005; 76: 691-695.

62. Bulut Ş, Uslu H, Özdemir BH, Bulut ÖE. Expression of caspase-3, p53 and Bcl-2 in generalized aggressive periodontitis. Head & Face Medicine. 2006, 2: 1-7.

63. Bursell S-E, Clermont AC, Aiello LP, Aiello LM, Schlossman DK, Feener EP, Laffel L, King GL. High-Dose vitamin E supplementation normalizes retinal blood flow and C reatinine clearance in patients with type 1 diabetes. Diabetes Care. 1999; 22: 1245-1251.

64. Byron KA, Varigos GA, Wootton AM. IL-4 production is increased in cigarette smokers. Clin Exp Immunol. 1994; 95: 333-336.

65. Cabrera PV, Blanco G, Alaniz L, Greczanik S, Garcia M, Alvarez E, Hojos SE. CD44 and hyaluronic acid regulate in vivo iNOS expression and metalloproteinase activity in murine air-pouch inflammation. Inflamm Res. 2004; 53: 556-566.

66. Caffesse RG, De La Rosa RM, De La Rosa GM, Weltman R. Effect of interleukin-1 gene polymorphism in a periodontally healthy hispanic population treated with mucogingival surgery. J Clin Periodontol. 2002; 29: 177-181.

67. Cai L, Li W, Wang G, Guo L, Jiang Y, Kang YJ. Hiperglycemia- Induced apoptosis in Mouse myocardium mitocondrial cytochrome c-Mediated caspase–3 activation pathway. Diabetes. 2002; 51: 1938-1948.

68. Calvisi DF, Ladu S, Hironaka K, Factor VM, Thorgeirsson SS. Vitamin E down-modulates iNOS and NADPH oxidase in c-Myc/TGF-a transgenic mouse model of liver cancer. Journal of Hepatology. 2004; 41: 815-822.

69. Cameron NE, Cotter MA. Neurovascular dysfunction in diabetic rats: Potential contribution of autoxidation and free radicals examined using transition metal chelating agents. J Clin Invest. 1995; 96: 1159-1163.

70. Campus G, Salem A, Uzzau S, Baldoni E, Tonolo G. Diabetes and Periodontal disease: A case-control study. J Periodontol. 2005; 76: 418-425.

71. Canter PH, Wider B, Ernst E. The antioxidant vitamins A, C, E and selenium in the treatment of arthritis: a systematic review of randomized clinical trials. Rheumatology. 2007; 46: 1223-1233.

72. Cao XX, Mohuiddin I, Ece F, McConkey DJ, Smythe WR. Histone deacetylase inhibitor downregulation of bcl-xl gene expression leads to apoptotic cell death in mesothelioma. Am J Respir Cell Mol Biol. 2001; 25: 562-568.

73. Carranza FA, Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR. Clinical Periodontology, Tenth edition, China, Saunders, 2007, 233-362.

74. Carpenter JF. Management of a patient who developed uncontrolled diabetes after implant placement: A case report. The Journal of Implant & Advanced Clinical Dentistry. 2010; 2: 81-87.

75. Cederberg J, Simân CM, Eriksson UJ. Combined treatment with vitamin E and vitamin C desreases oxidative stres and improves fetal outcome in experimental diabetic pregnancy. Pediatr Res. 2001; 49: 755-762.

76. Ceriello A, Quagliaro L, D'Amico M, Di Filippo C, Marfella R, Nappo F, Berrino L, Rossi F, Giugliano D. Acute hyperglycemia induces nitrotyrosine formation and apoptosis in perfused heart from rat. Diabetes. 2002; 51: 1076-1082.

77. Ceriello A. New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a "Causal" antioxidant therapy. Diabetes Care. 2003; 26: 1589-1596.

78. Chae H-J, Ha K-C, Jeon M-S, Yun D-H, Chin H-Y, Chae S-W, Kim H-R. Nitric oxide protects reactive oxygen species-induced apoptosis in H9C2 cardiac muscle cells. Kor J Gerontol. 2003; 13: 32-38.

79. Chan J, Tanaka K, Carrol D, Flynn J, Bloom BR. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on murine infection with Mycobacterium tuberculosis infection and immunity. 1995; 63: 736-740.

80. Chandrasekharan B, Srinivasan S. Diabetes and the enteric nervous system. Neurogastroenterol Motil. 2007; 19: 951-960.

81. Chapple ILC, Brock G, Eftimiadi C, Matthews JB. Glutathione in gingival crevicular fluid and its relation to local antioxidant capacity in periodontal health and disease. J Clin Pathol: Mol Pathol 2002; 55: 367-373.

82. Chapple ILC. Oxidative stress, nutrition and neutrogenomics in Periodontal health and disease. Int J Dent Hygiene. 2006; 4: 15-21.

83. Chapple ILC, Matthews JB. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. Periodontology 2000. 2007; 43: 160-232.

84. Cheng X, Cheng XS, Kuo K-H, Pang CCY. İnhibition of iNOS augments cardiovascular action of noradrenaline in streptozotocin-induced diabetes. Cardiovascular Research. 2004; 64: 298-307.

85. Chis IC, Ungureanu MI, Marton A, Simedrea R, Muresan A, Postescu I-D, Decea N. Antioxidant effects of a grape seed extract in a rat model of diabetes mellitus. Diab Vasc Dis Res. 2009; 6; 200-204.

86. Choi D, Radziszewska A, Schroer SA, Liadis N, Liu Y, Zhang Y, Lam PLP, Sheu L, Hao Z, Gaisano HY, Woo M. Deletion of Fas in the pancreatic β-cells leads to enhanced insulin secretion. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2009; 297: E1304-E1312.

87. Choudhary N, Ahlawat RS. Interleukin-6 and C-Reactive protein in pathogenesis of diabetic nephropathy new evidence linking inflammation, glycemic control, and microalbuminuria. IJKD. 2008; 2: 72-79.

88. Christgau M, Palitzsch K-D, Schmalz G, Kreiner U, Frenzel S. Healing response to non-surgical periodontal therapy in patients with diabetes mellitus: clinical, microbiological, and immunologic results. J Clin Periodontol. 1998; 25: 112-124.

89. Ciantar M, Gilthorpe MS, Hurel SJ, Newman HN, Wilson M, Spratt DA. Capnocytophaga spp. in periodontitis patients manifesting diabetes mellitus. J Periodontol. 2005; 76: 194-203.

90. Clancy RM, Amin AR, Abramson SB. The role of nitric oxide in inflammation and immunity. Arthritis & Rheumatism. 1998; 41: 1141-1151.

91. Clemens MG. Nitric oxide in liver injury. Hepatology. 1999; 30: 1-5.

92. Cohen ME, Meyer DM. Effect of dietary vitamin E supplementation and rotational stres on alveolar bone loss in rice rats. Archs oral biol. 1993; 38: 601-606.

93. Correa FOB, Gonçalves D, Figueredo CMS, Gustafsson A, Orrico SRP. The short-term effectiveness of non-surgical treatment in reducing levels of interleukin-1β and proteases in gingival crevicular fluid from patients with type 2 diabetes mellitus and chronic periodontitis. J Periodontol. 2008; 79: 2143-2150.

94. Correa FOB, Gonçalves D, Figueredo CMS, Bastos AS, Gustafsson A, Orrico SRP. Effect of periodontal treatment on metabolic control, systemic inflammation and cytokines in patients with type 2 diabetes. J Clin Periodontol. 2010; 37: 53-58.

95. Conner EM, Brand SJ, Davis JM, Kanhg DY, Grisham MB. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease: Toxins, mediators, and modulators of gene expression. Inflammatory Bowel Diseases. 1996; 2: 133-147.

96. Corbett JA, Sweetland MA, Wang JL, Lancaster JR Jr, Mcdaniel ML. Nitric oxide mediates cytokine-induced inhibition of insulin secretion by human islets of Langerhans. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 1731-1735.

97. Crawford JM, Wilton JMA, Richardson P. Neutrophils die in the gingival crevice, Periodontal pocket, and oral cavity by necrosis and not apoptosis. J Periodontol. 2000; 71: 1121-1129.

98. Creager MA, Lüscher TF, Cosentino F, Beckman JA. Diabetes and vascular disease pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part I. Circulation. 2003; 108; 1527-1532.

99. Cruz GA, Toledo S, Sallum EA, Sallum AW, Ambrosano GMB, Sadri JCO, Cruz SEB, Gonçalves RB. Clinical and laboratory evaluations of non-surgial periodontal treatment in subjects with diabetes mellitus. J Periodontol. 2008; 79: 1150-1157.

100. Cui S, Reichner JS, Mateo RB, Albina JE. Activated murine macrophages induce apoptosis in tumor cells through nitric oxide-dependent or -independent mechanisms. Cancer Research. 1994; 54: 2462-2467.

101. Cutando A, Gómez-Moreno G, Villalba J, Ferrera MJ, Escames G, Escames G, Acuña-Castroviejo D. Relationship between salivary melatonin levels and periodontal status in diabetic patients. J Pineal Res. 2003; 35: 239-244.

102. Cutando A, Arana C, Gómez-Moreno G, Escames G, López A, Ferrera MJ, Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D. Local application of melatonin into alveolar sockets of beagle dogs reduces tooth removal–induced oxidative stress. J Periodontol. 2007; 78: 576-583.

103. Çelik S, Baydaş G, Yılmaz Ö. Influence of vitamin E on the levels of fatty acids and MDA in some tissues of diabetic rats. Cell Biochem Funct. 2002; 20: 67-71.

104. Daghigh F, Borghaei RC, Thornton RD, Bee JH. Human gingival fibroblasts produce nitric oxide in response to proinflammatory cytokines. J Periodontol. 2002; 73: 392-400.

105. Dandona L, Dandona R, Naduvilath TJ, A McCarty C, N Rao G.Population based assessment of diabetic retinopathy in an urban population in southern India. Br J Ophthalmol. 1999; 83: 937-940.

106. Davi G, Ciabattoni G, Consoli A, Mezzetti A, Falco A, Santarone S, Penese E, Vitacolonna E, Bucciarelli T, Costantini F, Capani F, Patrono C. In vivo formation of 8-iso-prostaglandin $F_{2\alpha}$ and platelet activation in diabetes mellitus effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation. Circulation. 1999; 99: 224-229.

107. Dennison DK, Van Dyke TE. The acute inflammatory response and the role of phagocytic cells in periodontal health and disease. Periodontology 2000. 1997; 14: 54-78.

108. Desta T, Graves DT. Fibroblast apoptosis induced by *Porphyromonas gingivalis* is stimulated by a gingipain and caspase-independent pathway that involves apoptosis-inducing factor. Cellular Microbiology. 2007; 9: 2667-2675.

109. Devaraj S, Jialal I. α-tocopherol decreases interleukin-1β release from activated human monocytes by inhibition of 5-lipoxygenase. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1999; 19: 1125-1133.

110. Devaraj S, Jialal I. Low-density lipoprotein postsecretory modification, monocyte function, and circulating adhesion molecules in Type 2 diabetic patients with and without macrovascular complications. The effect of α-tocopherol supplementation. Circulation. 2000a;102: 191-196.

111. Devaraj S, Jialal I. Alpha tocopherol supplementatıon decreases serum c-reactive proteın and monocyte interleukin-6 levels in normal volunteers and type 2 diabetic patients. Free Radical Biology & Medicine. 2000b; 29: 790-792.

112. Devaraj S, Leonard S, Traber MG, Jialal I. Gamma-tocopherol supplementation alone and in combination with alpha-tocopherol alters biomarkers of oxidative stress and inflammation in subjects with metabolic syndrome. Free Radical Biology & Medicine. 2008; 44: 1203-1208.

113. Dias AS, Porawski M, Alonso M, Marroni N, Collado PS, González-Gallego J. Quercetin decreases oxidative stres, $NF\text{-}_KB$ activation, and iNOS overexpression in liver of streptozotocin-induced diabetic rats. J Nutr. 2005; 135: 2299-2304.

114. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-l in disease. Blood. 1996; 87: 2095-2147.

115. Dinarello CA. Proinflammatory ctokines. Chest. 2000; 118; 503-508.

116. Donath MY, Gross DJ, Cerasi E, Kaiser N. Hyperglycemia-induced β-Cell apoptosis in pancreatic islets of *Psammomys obesus* during development of diabetes. Diabetes. 1999; 48: 738-344.

117. Donath MY, Mandrup-Poulsen T. The use of interleukin-1-reseptor antagonists in the treatment of diabetes mellitus. Nature Clinical Practise. 2008; 4: 240-241.

118. Donati M, Berglundh T, Hytönen A-M, Hahn-Zoric M, Hanson L-Å, Padyukov L. Association of the -159 CD14 gene polymorphism and lack of association of the -308 TNFA and Q551R IL-

4RA polymorphisms with severe chronic periodontitis in Swedish Caucasians. J Clin Periodontol. 2005; 32: 474-479.

119. Dongari-Bagtzoglou Al, Ebersole JL. Increased presence of interleukin-6 (IL-6) and IL-8 secreting fibroblast subpopulations in adult periodontitis. J Periodontol. 1998; 69: 899-910.

120. Di Paola R, Mazzon E, Zito D, Maiere D, Britti D, Genovese T, Cuzzocrea S. Effects of Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, in a rodent model periodontitis. J Clin Periodontol. 2005; 32: 1062-1068.

121. Di Paola R, Mazzon E, Maiere D, Zito D, Britti D, De Majo M, Genovese T and Cuzzocrea S. Rosiglitazone Reduces the Evolution of Experimental Periodontitis in the Rat. J Dent Res. 2006; 85: 156-161.

122. Downey D, Elborn JS. Nitric oxide, iNOS, and inflammation in cystic fibrosis. J Pathol. 2000; 190: 115-116.

123. Doxey DL, Cutler CW, Iacopino AM. Diabetes prevents periodontitis-induced increases in gingival platelet derived growth factor-B and interleukin 1-Beta in a rat model, J Periodontol. 1998, 69, 113-119.

124. Druzhyna NM, Musiyenko SI, Wilson GL, LeDoux SP. Cytokines induce nitric oxide-mediated mtDNA damage and apoptosis in oligodendrocytes. The Journal of Biological Chemistry. 2005; 280: 21673-21679.

125. Duarte PM, da Rocha M, Sampaio E, Mestnik MJ, Feres M, Figueiredo LC, Bastos MF, Faveri M. Serum levels of cytokines in subjects with generalized chronic and aggressive periodontitis before and after non-surgical periodontal therapy: a pilot study. J Periodontol. 2010; 81: 1056-1063.

126. Dugo L, Marzocco S, Mazzon E, Di Paola R, Genovese T, Caputi AP,Salvatore Cuzzocrea. Effects of GW274150, a novel and selective inhibitor of iNOS activity, in acute lung inflammation. British Journal of Pharmacology. 2004; 141: 979-987.

127. Dzietko M, Boos V, Sifringer M, Polley O, Gerstner B, Genz K, Endesfelder S, PhD, Börner C, Jacotot E, Chauvier D, Obladen M, Bührer C, Felderhoff-Mueser U. A critical role for Fas/CD-95 dependent signaling pathways in the pathogenesis of hyperoxia-induced brain injury. Ann Neurol. 2008; 64: 664-673.

128. Ejeil A-L, Gaultier F, Igondjo-Tchen S, Seni K, Pellat B, Gordeau G, Gogly B. Are cytokines linked to collagen breakdown during periodontal disease progression. J Periodontol. 2003;74:196-201.

129. Engebretson SP, Hey-Hadavi J, Ehrhardt FJ, Hsu D, Celenti RS, Grbic JT, Lamster IB. Gingival crevicular fluid levels of interleukin-1β and glycemic control in patients with chronic periodontitis and type 2 diabetes. J Periodontol. 2004; 75: 1203-1208.

130. Erdemir EO, Mısırlıoğlu M, Nalçacı R, Apan T, Demirer S. Kronik periodontitisli hastalarda başlangıç periodontal tedavinin klinik parametreler ve dişeti oluğu sıvısı IL-6 ve IL-8 miktarı üzerine etkisi. Türkiye Klinikleri J Dental Sci. 2007; 13: 41-47.

131. Esposti MD. Mitochondria in apoptosis: past, present and future. Biochemical Society Transactions. 2004; 32: 493-495.

132. Evans M, Anderson RA, Smith JC, Khan N, Gramham JM, Thomas AW, Morris K, Deely D, Frenneaux MP, Davies JS, Rees A. Effects of insulin lispro and chronic citamin C therapy on postprandial lipaemia, oxidative stres and endothelial function in patients with type 2 diabetes mellitus. European Journal of Clinical Investigation. 2003; 33: 231-238.

133. Fadeel B, Orrenius S, Zhivotovsky B. Apoptosis in human disease: A new skin for the old ceremony? Biochemical and Biophysical Research Communications. 1999; 266: 699-717.

134. Federici M, Hribal M, Perego L, Ranalli M, Caradonna Z, Perego C, Usellini L, Nano R, Bonini P, Bertuzzi F, Marlier LNJL, Davalli AM, Carandente O, Pontiroli AE, Melino G, Marchetti P, Lauro R, Sesti G, Folli F. High glucose causes apoptosis in cultured human pancreatic islets of langerhans: A potential role for regulation of specific Bcl family genes toward an apoptotic cell death program. Diabetes. 2001; 50: 1290-1301.

135. Ferrari D, Pinton P, Campanella M, Callegari MG, Pizzirani C, Rimessi A, Di Virgilio F, Pozzan T, Rizzuto R. Functional and structural alterations in the endoplasmic reticulum and mitochondria during apoptosis triggered by C2-ceramide and CD95/APO-1/FAS receptor stimulation. BBRC. 2010; 391: 575-581.

136. Flemmig TF. Periodontitis. Ann Periodontol. 1999; 4: 32- 37.

137. Foss-Freitas MC, Foss NT, Donaldi EA, Foss MC. Effect of metabolic control on interferon-γ and interleukin–10 production by peripheral blood mononuclear cells from type 1 and type 2 diabetic patients. Braz J Med Biol Res. 2007; 40: 671-677.

138. Franch-Chillida F, Nibali L, Madden I, Donos N, Brett P. Association between interleukin-6 polymorphisms and periodontitis in Indian non-smokers. J Clin Periodontol. 2010; 37: 137-144.

139. Franchimont N, Rydziel S, Canalis E. Interleukin 6 is autoregulated by transcriptional mechanisms in cultures of rat osteoblastic cells. J Clin Invest. 1997; 100: 1797-1803.

140. Franz S, Gaipl US, Munoz LE, Sheriff A, Beer A, Kalden JR, Herrmann M. Apoptosis and autoimmunity: When apoptotic cells break their silence. Current Rheumatology Reports. 2006; 8: 245-247.

141. Friedlander RM, Gagliardini V, Rotello L, Yuan J. Functional role of interleukin 1β (IL-1β) in IL-lβ-converting enzyme-mediated apoptosis. J. Exp. Med. 1996; 184: 717-724.

142. Fujimoto M, Shimizu N, Kunii K, Martyn JAJ, Ueki K, Kaneki M. A role for iNOS in fasting Hyperglycemia and impaired insulin signaling in the liver of obese diabetic mice. Diabetes. 2005; 54: 1340-1348.

143. Fujita T, Ogihara N, Kamura Y, Satomura A, Fuke Y, Shimizu C, Wada Y, Matsumoto K. Interleukin-18 contributes more closely to the progression of diabetic nephropathy than other diabetic complications. Acta Diabetol. 2010; 1007: 1-7.

144. Gaffen SL, Hajishengallis G. A new inflammatory cytokine on the block: Re-thinking periodontal disease and the Th1/Th2 paradigm in the context of Th17 cells and IL-17. J Dent Res. 2008; 87: 817-828.

145. Gamonal J, Bascones A, Acevedo A, Blanco E, Silva A. Apoptosis in chronic adult periodontitis analyzed by in situ DNA breaks, electron microscopy, and immunohistochemistry. J Periodontol. 2001; 72: 517-525.

146. Gamonal J, Sanz M, O'Connor A, Acevedo A, Suarez I, Sanz A, Martínez B, Silva A. Delayed neutrophil apoptosis in chronic periodontitis patients. J Clin Periodontol. 2003; 30: 616-623.

147. Garcia-Calvo M, Peterson EP, Rasper DM, Vaillancourt JP, Zamboni R, Nicholson DW, Thornberry NA. Purification and catalytic properties of human caspase family members. Cell Death and Differentiation. 1999; 6: 362-369.

148. Gastman BR. Apoptosis and its clinical impact. Head Neck. 2001; 23: 409-425.

149. Gazis A, White DJ, Page SR, Cockcroft JR. Effect of oral vitamin E (α-tocopherol) suplementation on vascular endothelial function in type 2 diabetes mellitus. Diabet Med. 1999; 16: 304-311.

150. Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. PeriodonroIogy 2000. 1997; 14: 112-143.

151. Gerdhem P, Isaksson A, Akesson K, Obrant KJ. Increased bone density and decreased bone turnover, but no evident alteration of fracture susceptibility in elderly women with diabetes mellitus. Osteoporos Int. 2005; 16: 1506-1512.

152. Geske FJ, Gerschenson LE. The biology of apoptosis. Hum Pathol. 2001; 32: 1029-1038.

153. Gey KF, Puska P, Jordan P, Moser UK. Inverse correlation between plasma vitamin E and mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology. Am J Clin Nutr. 1991; 53: 326- 345.

154. Ghosh S, Pulinilkunnil T, Yuen G, Kewalramani G, An D, Qi D, Abrahani A, Rodrigues B. Cardiomyocyte apoptosis induced by short-term diabetes requires mitochondrial GSH depletion. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005; 289: 768-776.

155. Giannopoulou C, Cappuyns I, Mombelli A: Effect of smoking on gingival crevicular fluid cytokine profile during experimental gingivitis. J Clin Periodontol. 2003a; 30: 996-1002.

156. Giannopoulou C, Kamma JJ, Mombelli A. Effect of inflammation, smoking and stress on gingival crevicular fluid cytokine level. J Clin Periodontol. 2003b; 30:145-153.

157. Giulietti A, Gysemans C, Stoffels K, Van Etten E, Decallonne B, Overbergh L, Bouillon R, Mathieu C. Vitamin D deficiency in early life accelerates type 1 diabetes in non-obese diabetic mice. Diabetologia. 2004; 47: 451-462.

158. Godbout JP, Berg BM, Kelley KW, Johnson RW. α-Tocopherol reduces lipopolysaccharide-induced peroxide radical formation and interleukin-6 secretion in primary murine microglia and in brain. Journal of Neuroimmunology. 2004; 149: 101-109.

159. Godbout JP, Berg BM, Krzyszton C, Johnson RW. α-Tocopherol attenuates NFκB activation and pro-inflammatory cytokine production in brain and improves recovery from lipopolysaccharide-induced sickness behavior. Journal of Neuroimmunology. 2005; 169: 97-105.

160. Gogvadze V, Orrenius S. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. Chemico-Biological Interactions. 2006; 163: 4-14.

161. Gold SI. Pæriodontics. The past Microbiology Part (III). Journal of Clinical Periodontology 1985: 12: 257-269.

162. Gonzàlez-Correa JA, Arrebola MM, Cansino AL, J. Munoz-Marin J, Guerrero A, De La Cuesta FS, De La Cruz JP. Effects of aspirin plus alpha-tocopherol on brain slices damage after hypoxia-reoxygenation in rats with type 1-like diabetes mellitus. Neuroscience Letters. 2006; 400: 252-257.

163. Gonzales JR, Kobayashi T, Michel J, Mann M, Yoshie H, Meyle J. Interleukin-4 gene polymorphisms in Japanese and Caucasian patients with aggressive periodontitis. J Clin Periodontol. 2004; 31: 384-389.

164. Gonzales JR, Mann M, Stelzig J, Bödeker RH, Meyle J. Single nucleotide polymorphisms in the IL-4 and IL-13 promoter region in aggressive periodontitis. J Clin Periodontol. 2007; 34: 473-479.

165. Górska R, Gregorek H, Kowalski J, Laskus-Perendyk A, Syczewska M, Madaliński K.Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. J Clin Periodontol. 2003; 30: 1046-1052.

166. Gökkuşu C, Palanduz Ş, Ademoğlu E, Tamer Ş. Oxidant and antioxcidant systems in niddm patients: Influence of vitamin E suplementation. Endocrine Research. 2001; 27: 377-386.

167. Graves DT, Oskoui M, Volejnikova S, Naguib G, Cai S, Desta T, Kakouras A, Jiang Y. Tumor necrosis factor modulates fibroblast apoptosis PMN recruitment, and osteoclast formation in response to *P.gingivalis* infecction. J Dent Res. 2001; 80: 1875-1879.

168. Grisham MB, Jourd'heuil D, Wink DA. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. Am. J. Physiol. 1999; 276: 315-321.

169. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. Genes Dev. 1999; 13: 1899-1911.

170. Gross JL, Azevedo MJ, Silverio SP, Canani LH, Caramori ML, Zelmanovitz T. Diabetic nephropathy: Diagnosis, prevention, and treatment. Diabetes Care. 2005; 28: 176-188.

171. Gu X, Song X, Dong Y, Cai H, Walters E, Zhang R, Pang X, Xie T, Guo Y, Sridhar R, Califano JA. Vitamin E succinate induces ceramide-mediated apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma *In vitro* and *In vivo.* Clin Cancer Res. 2008;14: 1840-1848.

172. Guo C, Quobatari A, Shangguan Y, Hong S, Wiley JW, Quobatari A. diabetic autonomic neuropathy: evidence for apoptosis *in situ* in the rat. Neurogastroenterol Motil. 2004; 16: 335-345.

173. Gurel A, Armutcu F, Sahin S, Sogut S, Ozyurt H, Gulec M, Kutlu NO, Akyol O. Protective role of α-tocopherol and caffeic acid phenethyl ester on ischemia-reperfusion injury via nitric oxide and myeloperoxidase in rat kidneys. Clinica Chimica Acta. 2004; 339: 33-41.

174. Güllü C, Ozmeric N, Tokman B, Elgun S, Balos K. Effectiveness of scaling and root planing versus modified Widman flap on nitric oxide synthase and arginase activity in patients with chronic periodontitis. J Periodont Res. 2005; 40; 168-175.

175. Gümüş P, Buduneli N, Çetinkalp Ş, Hawkins SI, Renaud D, Kinane DF, Scott DA. Salivary antioxidants in patients with type 1 or 2 diabetes and inflammatory Periodontal disease: A case-control study. J Periodontol. 2009; 80: 1440-1446.

176. Gwozdziewiczová S, Lichnovská, Yahia RB, Chlup R, Hřebíček J. TNF-α in the development of insulin resistance and other disorders in metabolic syndrome. Biomed Papers. 2005; 149(1): 109-117.

177. Ha H, Kwak HB, Lee SW, Jin HM, Kim HM, Kim HH, Lee ZH. Reactive oxygen species mediate RANK signaling in osteoclasts. Experimental Cell Research. 2004; 301: 119-127.

178. Häcker G. The morphology of apoptosis. Cell Tissue Res. 2000; 301: 5-17.

179. Haffajee AD, Socransky SS, Patel MR, Song X. Microbial complexes in supragingival Plaque. Oral Microbiol Immunol. 2008; 23: 196-205.

180. Hall JL, Matter CM, Wang X, Gibbons GH. Hyperglycemia inhibits vascular smooth muscle cell apoptosis through a protein kinase C-dependent pathway. Circ Res. 2000; 87: 574-580.

181. Halliwell B. Vitamin E and the treatment and prevention of diabetes: A case for a controlled clinical trial. Singapore Med J. 2002; 43: 479-484.

182. Hampson G, Evans C, Petitt RJ, Evans WD, Woodhead SJ, Peters JR, Ralston SH. Bone mineral density, collagen type 1 α 1 genotypes and bone turnover in premenopausal women with diabetes mellitus. Diabetologia. 1998; 41: 1314-1320.

183. Hauache OM, Lazaretti-Castro M, Andreoni S, Gimeno SGA, Brandao C, Ramalho AC, Kasamatsu TS, Kunii I, Hayashi LF, Dib SA, Vieira JGH. Vitamin D Receptor Gene Polymorphism: Correlation with Bone Mineral Density in a Brazilian Population with Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. Osteoporos Int. 1998; 8: 204-210.

184. Hayashi T, Faustman D. Role of defective apoptosis in type 1 diabetes and other autoimmune diseases. 2003: 131-153. Downloaded from rphr.endojournals.org by on November 15, 2010.

185. He H, Liu R, Desta T, Leone C, Gerstenfeld LC, Graves DT. Diabetes causes decreased osteoclastogenesis, reduced bone formation, and enhanced apoptosis of osteoblastic cells in bacteria stimulated bone loss. Endocrinology. 2004: 145: 447-452.

186. Hedayat M, Mahmoudi MJ, Rose NR, Rezaei N. Proinflammatory cytokines in heart failure: double-edged swords. Heart Fail Rev. 2010; 1007: 1-20.

187. Heitz-Mayfield LJA. Disease progressison: identification of high-risk groups and individuals for periodontitis. J Clin Periodontol. 2005; 32: 196-209.

188. Henson PM, Cosgrove GP, Vandivler RW. Apoptosis and cell homeostasis in chronic obstructive pulmonary disease. Proc Am Thorac Soc. 2006; 3: 512-518.

189. Herrman CE, Sanders RA, Klaunig JE, Schwarz LR, Watkins JB. Decreased apoptosis as a mechanism for hepatomegaly in stretozotocin-induced diabetic rats. Toxicological Sciences. 1999; 50: 146-151.

190. Hetts SW. To Die or Not to Die. JAMA. 1998; 279: 300-307.

191. Hibbs JB, Westenfelder C, Taintor R, Vavrin Z, Kablitz C, Baranowski RL, Ward JH, Menlove RL, McMurry MP, Kushner JP, Samlowski WE. Evidence for cytokine-inducible nitric oxide synthesis from L-Arginine in patients receiving interleukin-2 therapy. J. Clin. Invest. 1992. 89: 867-877.

192. Hildebolt CF. Effect of vitamin D and calsium on periodontitis. J Periodontol. 2005; 76: 1576-1587.

193. Hirose M, Ishihara K, Saito A, Nakagawa T, Yamada S, Okuda K. Expression of ctokines and inducible nitric oxide synthase in inflamed gingival tissue. J Periodontol. 2001; 72: 590-597.

194. Hockenbery D. Defining apoptosis. AJP. 1995; 146: 16-19.

195. Holla LI, Fassmann A, Augustin P, Halabala T, Znojil V, Vanek J. The Association of interleukin-4 haplotypes with chronic periodontitis in a czech population. J Periodontol. 2008; 79: 1927-1933.

196. Holt RIG. Diagnosis, epidemiology and pathogenesis of diabetes mellitus: An update for psychiatristis. British Journal of Psychiatry. 2004; 184: 55-63.

197. Holzhausen M, Garcia DF, Pepato MT, Marcantonio E Jr. The influence of short-term diabetes mellitus and insulin therapy on alveolarbone loss in rats. J Periodont Res. 2004; 39; 188-193.

198. Hom FG, Ettinger B, Lin M-J. Comparision of serum fructosamine vs glycohemoglobin as measures of glycemic control in a large diabetic population. Acta Diabetol. 1998; 35: 48-51.

199. Hortelano S, Alvarez AM, Boscá L. Nitric oxide induces tyrosine nitration and release of cytochrome *c* preceding an increase of mitochondrial transmembrane potential in macrophages. FASEB J. 1999; 13: 2311-2317.

200. Houde V, Grenier D, Chandad F. Protective effects of grape seed proanthocyanidins against oxidative stress induced by lipopolysaccharides of periodontopathogens. J Periodontol. 2006; 77: 1371-1379.

201. Hsiao G, Lee JJ, Chen Y-C, Lin J-H, Shen M-Y, Lin K-H, Chou D-S, Sheu J-R. Neuroprotective effects of PMC, a potent α-tocopherol derivative, in brain ischemia-reperfusion: Reduced neutrophil activation and anti-oxidant actions. Biochemical pharmacology. 2007; 73: 682-693.

202. Hughes FJ, Turner W, Belibasakis G, Martuscelli G. Effects of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation. Periodontology 2000. 2006; 41:48-72.

203. Huidobro A, Prentice A, Fulford T, Parodi C, Rozowski J. Gestational diabetes, comparison of women diagnosed in second and third trimester of pregnancy with non GDM women: Analysis of a cohort study. Rev Med Chile. 2010; 138: 316-321.

204. Huppertz B, Frank H-G, Kaufmann P. The apoptosis cascade-morphological and immunohistochemical methods for its visualization. Anat Embryol. 1999; 200: 1-18.

205. Hyppönen E, Läärä E, Reunanen A, Järvelin M-R, Virtanen SM. Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. Lancet. 2001; 358: 1500-03.

206. Iacopino AM. Periodontitis and diabetes interrelationships: Role of inflammation. Ann Periodontol. 2001; 6: 125-137.

207. Ido Y, Carling D, Ruderman N. Hyperglycemia-Induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells inhibition by the AMP-Activated protein kinase activation. Diabetes. 2002; 51: 159-167.

208. Ihara Y, Yamada Y, Toyokuni S, Miyawaki K, Ban N, Adachi T, Kuroe A, Iwakura T, Kubota A, Hiai H, Seino Y. Antioxidant α-tocopherol ameliorates Glysemic control og GK rats, a model of type 2 diabetes. FEBS Letters. 2000; 473: 24-26.

209. Ihm C-G, Park JK, Kim HJ, Lee TW, Cha DR. Effects of high glucose on interleukin-6 production in human mesangial cells. J Korean Med Sci. 2002; 17: 208-212.

210. Ing DJ, Zang J, Dzau VJ, Webster KA, Bishopric NH. Modulation of cytokine-induced cardiac myocyte apoptosis by nitric oxide, Bak, and Bcl-x. Circ Res. 1999; 84; 21-33.

211. Isenberg JS, Ridnour LA, Espey MG, Wink DA, Roberts DD. Nitric ocide in wound-healing. Mirosurgery. 2005; 25: 442-451.

212. Israels LG, Israels ED. Apoptosis. The Oncologist. 1999; 4: 332-339.

213. Iwamoto Y, Nishimura F, Nakagawa M, Sugimoto H, Shikata K, Makino H, Fukuda T, Tsuji T, ıwamoto M, Muramaya Y. The effect of antimicrobial Periodontal treatment on circulation tumor necrosis factor-alpha and glycated hemoglobin level in patients with type 2 diabetes. J Periodontol. 2001; 72: 774-778.

214. İmirzalıoğlu P, Uckan S, Alaaddinoğlu EE, Haberal A, Uckan D. Cigarette smoking and apoptosis. J Periodontol. 2005; 76: 737-739.

215. Jain SK, McVie R, Smith T. Vitamin E supplementation restores glutathione and malondialdehyde to normal concentrations in erythrocytes of type 1 diabetic children. Diabetes Care. 2000; 23: 1389-1394.

216. Jaiswal M, LaRusso NF, Burgart LJ, Gores GJ. Inflammatory cytokines induce DNA damage and inhibit DNA repair in cholangiocarcinoma cells by a nitric oxide-dependent mechanism. Cancer Research. 2000; 60: 184-190.

217. Jakus V. The role of free radicals, oxidative stres and antioxidant systems in diabetic vascular disease. Bratisl Lek Listy. 2000; 101: 541-551.

218. Jarnbring F, Somogyi E, Dalton J, Gustafsson A, Klinge B. Quantitative assessment of apoptotic and proliferative gingival keratinocytes in oral and sulcular epithelium in patients with gingivitis and periodontitis. J Clin Periodontol. 2002; 29: 1065-1071.

219. Javed F, Nasstrom K, Benchimol D, Altamash M, Klinge B, Engström PE. Comparison of Periodontal and Socioeconomic Status Between Subjects With Type 2 Diabetes Mellitus and Non-Diabetic Controls. J Periodontol. 2007; 78: 2112-2119.

220. Jeannin P, Lecoanet S, Delneste Y, Gauchat J-F, Bonnefoy J-Y. IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10. J. Immunol. 1998; 160; 3555-3561.

221. Jee SW, Wang S, Kapila YL. Spesific Pro-Apoptotic fibronectin fragments modulate proteinase expression in periodontal ligament cells. J Periodontol. 2004; 75: 523-530.

222. Jehle PM, Jehle DR, Mohan S, Böhm BO. Serum levels of insulin-like growth factor system components and relationship to bone metabolism in Type 1 and Type 2 diabetes mellitus patients. Journal of Endocrinology. 1998;159: 297-306.

223. Jepsen S, Eberhard J, Fricke D, Hedderich J, Siebert R, Açil Y. Interleukin-1 gene polymorphisms and experimental gingivitis. J Clin Periodontol. 2003; 30: 102-106.

224. Joussen AM, Doehmen S, Le ML, Koizumi K, Radetzky S, Krohne TU, Poulaki V, Semkova I, Kociok N. TNF-α mediated apoptosis plays an important role in the development of early diabetic retinopathy and long-term histopathological alterations. Molecular Vision. 2009; 15: 1418-1428.

225. Junior RBB, Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, Souza AP, Barros SP. Polymorphism in the Vitamin D receptor gene are associated with periodontal Disease. J Periodontol. 2004; 75: 1090-1095.

226. Kabayama K, Sato T, kitamura F, Uemura S, Kang BW, Igarashi Y, inokuchi J-İ. TNFα-induced insulin resistance in adipocytes as a membrane microdomain disorder: Involvement of ganglioside GM3 Glycobiology. 2005; 15: 21-29.

227. Kamma JJ, Giannopoulou C, Vasdekis VGS, Mombelli A. Cytokine profile in gingival crevicular fluid of aggressive periodontitis: influence of smoking and stress. J Clin Periodontol. 2004; 31: 894-902.

228. Kanai K, Kikuchi E, Mikami S, Suzuki E, Uchida Y, Kodaira K, Miyajima A, Ohigashi T, Nakashima J, Oya M. Vitamin E succinate induced apoptosis and enhanced chemosensitivity to paclitaxel in human bladder cancer cells *in vitro* and *in vivo*. Cancer Sci 2010; 101: 216-223.

229. Kaneda K, Kashii S, Kurosawa T, Kaneko S, Akaike A, Honda Y, Minami M, Satoh M. Apoptotic DNA fragmentation and upregulation of Bax induced by transient ischemia of the rat retina. Brain Research. 1999; 815: 11-20.

230. Katano H, Pesnicak L, Cohen JI. Simvastatin induces apoptosis of Epstein-Barr virus (EBV)-transformed lymphoblastoid cell lines and delays development of EBV lymphomas. PNAS. 2004; 101: 4960-4965.

231. Katz J, Chaushu G, Sharabi Y: On the association between hypercholesterolemia, cardiovascular disease and severe periodontal disease. J Clin Periodontol. 2001; 28: 865-868.

232. Keaney JF, Loscalzo J. Diabetes, oxidative stress, and platelet activation. Circulation. 1999; 99; 189-191.

233. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer. 1972; 26: 239-257.

234. Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis Its significance in cancer and cancer therapy. Cancer 1994; 73: 2013-2026.

235. Khader YS, Bawadi HA, Haroun TF, Alomari M, Tayyem RF. The association between periodontal desease and abesity among adult in Jordan. J Clin Periodontol. 2009; 36: 18-24.

236. Khanduja KL, , Avti PK, Kumar S, Pathania V, Chander Mohan Pathak. Inhibitory effect of vitamin E on proinflammatory cytokines-and endotoxin-induced nitric oxide release in alveolar macrophages. Life Sciences. 2005; 76: 2669-2680.

237. Khanna S, Roy S, Ryu H, Bahadduri P, Swaan PW, Ratan RR, Sen CK.Molecular Basis of Vitamin E Action: Tocotrienol modulates 12-lipoxygenase, a key mediator of glutamate-induced neurodegeneration. J Biol Chem. 2003; 278: 43508-43515.

238. Kim JE, Shklar G. The effect of vitamin E on the healing of gingival wounds in rats. J periodontol. 1983; May: 305-308.

239. Kim S-C, Kim O-S, Kim O-J, Kim Y-J, Chung H-J. Antioxidant profile of whole saliva after scaling and root planing in periodontal disease. J Periodontal Implant Sci. 2010; 40: 164-171.

240. Kinane DF, Tord Berglundh T, Lindhe J, Host-Parasite interactions in periodontal disease, in: Lindhe J, Karring T, Lang NP, editors. Clinical Periodontology and Implant Dentistry, fourth edition. Oxford: Blackwell Munksgaard. 2003; 150-175.

241. King GL. The role of inflammatory cytokines in diabetes and its complications. J Periodontol. 2008; 79: 1527-1534.

242. Kıran M, Arpak N, Ünsal E, Erdoğan MF. The effect of improved Periodontal health on metabolic control in type 2 diabetes mellitus. J Clin Periodontol. 2005; 32: 266-272.

243. Kramer JM, Gaffen SL. Interleukin-17: A new paradigm in inflammation, autoimmunity, and therapy. J Periodontol 2007; 78: 1083-1093.

244. Kristiansen OP, Mandrup-Poulsen T. Interleukin-6 and Diabetes The good, the bad, or the indifferent? Diabetes. 2005; 54: 114-124.

245. Koopman RJ, Mainous AG, Diaz VA, Geesey ME. Changes in age at diagnosis of type 2 diabetes mellitus in the United states, 1998 to 2000. Ann Fam Med. 2005; 3: 60-63.

246. Kuhr A, Popa-Wagner A, Schmoll H, Schwahn C, Kocher T. Observations on experimental marginal periodontitis in rats. J Periodont Res. 2004; 39: 101-106.

247. Kumamoto H, Kimi K, Ooya K. Immunohistochemical analysis of apoptosis-related factors (Fas, Fas ligand, caspase-3 and single-stranded DNA) in ameloblastomas. J Oral Pathol Med. 2001: 30: 596-602.

248. Kumar D, Alvaro MS, Julka IS, Marshall HJ. Diabetic peripheral neuropathy: Effectiveness of electrotherapy and amitriptyline for symptomatic relief. Diabetes Care. 1998; 21: 1322-1325.

249. Kuramitsu HK, Chen W, Ikegami A. Biofilm formation by the periodontopathic bacteria Treponema denticola and Porphyromonas gingivalis. J Periodontol. 2005;76: 2047-2051.

250. Kusner LL, Sarthy VP, Mohr S. Nuclear Translocation of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase: A role in high glucose-induced apoptosis in retinal muller cells. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2004; 45: 1553-1561.

251. Lalla E, Lamster IB, Drury S, Fu C, Schmidt AM. Hyperglycemia, glycoxidation and receptor for advanced glycation for advanced glycation endproducts: protential mechanisms underlying diabetic complications, including diabetes-associated periodontitis. Periodontology 2000. 2000; 23: 50-62.

252. Lalla E. Periodontal infections and diabetes mellitus: when will the puzzle be complete? J Clin Periodontol. 2007; 34: 913-916.

253. Lappin DF, Eapen B, Robertson D, Young J, Hodge PJ. Markers of bone destruction and formation and periodontitis in type 1 diabetes mellitus. J Clin Periodontol. 2009; 36: 634-641.

254. Lawen A. Apoptosis-an introduction. BioEssays. 2003; 25: 888-896.

255. Lean JM, Julie T. Davies JT, Fuller K, Jagger CJ, Kirstein B, Partington GA, Urry ZL, Chambers. TJ A crucial role for thiol antioxidants in estrogen-deficiency bone loss. J. Clin. Invest. 2003; 112: 915-923.

256. Lee M-S. Cytokine synergism in apoptosis: Its role in diabetes and cancer. Journal of Biochemistry and Maolecular Biology. 2002; 35: 55-60.

257. Lee DH, Folsom AR, Harnack L, Halliwell B, Jacobs Jr DR. Does supplemental vitamin C increase cardiovascular disease risk in women with diabetes? Ann J Clin Nutr. 2004; 80: 1194-2000.

258. Lehto S, Rönnemaa T, Pyörälä K, Laakso M. cordiovascular risk factors clustering with endogenous hyperinsulinaemia predict death from coronary heart disease in patients with Type II diabetes. Diabetologia. 2000; 43: 148-155.

259. Leitão RFC, Rocha FAC, Chaves HV, Lima V, Cunha FQ, Ribeiro RA, Brito GAC. Locally applied isosorvide decreases bone resorption in experimental periodontitis in rats. J Periodontol. 2004; 75: 1227-1232.

260. Leitão RFC, Ribeiro RA, Chaves HV, Rocha FAC, Lima V, Brito GAC. Nitric oxide synthase inhibition prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. J Periodontol. 2005; 76: 956-963.

261. Leonardi O, Mints G, Hussain MA. Beta-cell apoptosis in the pathogenesis of human type 2 diabetes mellitus. European Journal of Endocrinology. 2003; 149: 99-102.

262. Lerner UH. Inflammation-induced Bone Remodeling in Periodontal Disease and the Influence of Post-menopausal Osteoporosis. J Dent Res. 2006; 85: 596-607.

263. Li W, Hellsten A, Jacobsson LS, Blomqvist HM, Olsson AG, Yuan X-M. Alpha-tocopherol and astaxanthin decrease macrophage infiltration, apoptosis and vulnerability in atheroma of hyperlipidaemic rabbits. Journal of Molecular and Cellular Cardiology. 2004; 37: 969-978.

264. Li S-Y, Sigmon VK, Babcock SA, Ren J. Advanced glycation endproduct induces ROS accumulation, apoptosis, MAP kinase activation and nuclear *O*-GlcNAcylation in human cardiac myocytes. Life Sciences. 2007; 80: 1051-1056.

265. Liadis N, Murakami K, Eweida M, Elford AR, Sheu L, Gaisano HY, Hakem R, Ohashi PS, Woo M. Caspase-3-dependent β-cell apoptosis in the initiation of autoimmune diabetes mellitus. Molecular and Cellular Biology. 2005; 25: 3620-3629.

266. Linden G, Patterson C, Evans A, Kee F. Obesity and periodontitis in 60-70-year-old men. J Clin Periodontol. 2007; 34: 461-466.

267. Linkermann A, Qian J, Kabelitz D, Janssen O. The Fas ligand as a cell death factor and signal transducer. Signal Transduction. 2003; 1-2: 33-46.

268. Liu D, Pavlovic D, Chen M-C, Flodström M, Sandler S, Eizirik DL. Cytokines induce apoptosis in β-cells isolated from mice lacking the inducible isoform of nitric oxide synthase (iNOS$^{-/-}$). Diabetes. 2000; 49: 1116-1122.

269. Liu S, Lee I-M, Song Y, Denburgh MV,1 Cook NR, Manson JE, Buring JE. Vitamin E and risk of type 2 diabetes in the women's health study randomized controlled trial. Diabetes. 2006; 55: 2856-2862.

270. Liu F, Xia M, Xu A. Expression of VEGF, İNOS and eNOS is increased in cochlea of diabetic rat. Acta Oto-Laryngologica. 2008; 128: 1178-1186.

271. Li-Weber M, Weigand MA, Giaisi M, Süss D, Monika K. Treiber MK, Baumann S, Ritsou E, Breitkreutz R, and Peter H. Krammer. Vitamin E inhibits CD95 ligand expression and protects T cells from activation-induced cell death. J. Clin. Invest. 2002; 110: 681-690.

272. Lo Y-J, Liu C-M, Wong M-Y, Hou L-T, Chang W-K. Interleukin 1β-secreting cells in inflamed gingival tissue of adult periodontitis patients. Cytokine. 1999; 11: 626-633.

273. Lohinai Z, Benedek P, Feher E, Györfi A, Rosivall L, Fazekas A, Salzman AL, Szabó C. Protective effects of mercaptoethylguanidine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase, in ligature-induced periodontitis in the rat. British Journal of Pharmacology. 1998; 123; 353-360.

274. Lohinai Z, Stachlewitz R, Virag L, Szekely AD, Hask G, and Szabo C. Evidence for reactive nitrogen species formation in the gingivomucosal tissue. J Dent Res. 2001; 80: 470-475.

275. Loro LL, Vintermyr OK, Johannessen AC. Apoptosis in normal and diseased oral tissues. Oral Diseases. 2005; 11: 274-287.

276. Loos BG, Craandijk J, Hoek FJ, Paulien ME, van Dillen W, van der Velden U. Elevation of systemic markers related to cardiovascular diseases in the pheriferal blood of periodontitis patients. J Periodontol. 2000;71: 1528-1534.

277. Lotem J, Sachs L. Cytokines as suppressors of apoptosis. Apoptosis. 1999; 4: 187-196.

278. Lowe GDO. The relationship between infection, inflammation, and cardiocascular disease: An overview. Ann Periodontol. 2001; 6: 1-8.

279. Ludwig L, Seraphim D, Lorenzetti F, Bertolla RP, Ortiz V, Dambros M. Inhibitory activity of α-Tocoferol on apoptosis in the rat bladder wall subjected to androgen deprivation. Neurourol. Urodynam. 2010; 10.1002: 1-5.

280. Luo JD, Chen AF. Nitric oxide: a newly discovered function on wound healing. Acta Pharmacologia Sinica. 2005; 26: 259-264.

281. MacMicking J, Xie Q-w,Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. Annu Rev Immunol. 1997; 15: 323-350.

282. Manderscheid M, Meβmer UK, Franzen R, Pfeilschifter J. Regulation of inhibitor of apoptosis expression by nitric oxide and cytokines: Relation to apoptosis induction in rat mesangial cells and RAW 264.7 macrophages. J Am Soc Nephrol. 2001; 12: 1151-1163.

283. Mandrup-Poulsen T, Pickersgill L, Donath MY. Blockade of interleukin-1 in type 1 diabetes mellitus. Nat Rev Endocrinol. 2010; 5: 158-166.

284. Manning PJ, Sutherland WHF, Walker RJ, Williams SM, Jong SA, Ryalls AR, Berry EA. Effect of high-dose vitamin E on insulin resistance and associatted parameters in overweight subject. Diabetes Care. 2004; 27: 2166-2171.

285. Marfella R, Di Filippo C, Esposito K, Nappo F, Piegari E, Cuzzocrea S, Berrino L, Rossi F, Giugliano D, D'Amico M. absence of inducible nitric oxide synthase reduces myocardial damage during ischemia reperfusion in streptozotocin-induced hyperglycemic mice. Diabetes. 2004; 53: 454-462.

286. Mariotti A. Dental plaque-induced gingival diseases. Ann Periodontol. 1999; 4: 7-17.

287. Marso SP. The pathogenesis of type 2 diabetes and cardiovascular disease. British Journal of Diabetes & Vascular Disease. 2002; 2: 350-356.

288. McIntyre BS, Briksi KP, Gapor A, Sylvester PW. Antiproliferative and apoptotic effects of tocopherols and tocotrienols on preneoplastic and neoplastic Mouse mammary epithelial cells. PSEBM. 2000; 224: 292-301.

289. Mealey BL, Moritz Aj. Hormonal influences: effects of diabetes mellitus and endogenous female sex steroid hormones on the periodontium. Periodontology 2000. 2003; 32: 59-81.

290. Mealey BL, Oates TW. Diabetes mellitus and periodontal diseases. J Periodontol. 2006; 77: 1289-1303.

291. Mealey BL. Periodontal disease and diabetes: A two-way street. JADA. 2006; 137: 26-31.

292. Mealey BL, Ocampo GL. Diabetes mellitus and periodontal disease. Periodontology 2000. 2007; 44: 127-153.

293. Mehat MZ, Shuid AN, Norazlina Mohamed , Norliza Muhammad, Ima Nirwana Soelaiman. Beneficial effects of vitamin E isomer supplementation on static and dynamic bone histomorphometry parameters in normal male rats. J Bone Miner Metab. 2010; 28: 503-509.

294. Mellado-Gil JM, Aguilar-Diosdado M. High glucose potentiates cytokine- and streptozotocin-induced apoptosis of rat islet cells: effect on apoptosis-related genes. Journal of Endocrinology. 2004; 183: 155-162.

295. Merime T. The interface between diabetic retinopathy, diabetes management, and insulin-like growth factors. JCEM. 1997; 82: 2806-2808.

296. McGuirk P, Higgins SC, Mills KHG. The role of regulatory T cells in respiratory infections and allergy and asthma. Cur Allergy Asthma Rep. 2010; 10: 10-21.

297. Mirończuk K, Okruszko A, Wawrusiewicz-Kurylonek N, Kretowski A, Kinalska I, Górska M. Interleukin 18 and sICAM-1 serum levels in families with type 1 diabetes mellitus. Annales Academiae Medicae Bialostocensis. 2005; 50: 151-154.

298. Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human *bax g*ene. Cell. 1995; 80: 293-299.

299. Mo H, Elson CE. Apoptosis and cell-cycle arrest in human and murine tumor cells are initiated by isoprenoids. J Nutr. 1999; 129: 804-813.

300. Mohiuddin I, Cao X, Fang B, Nishizaki M, Smythe WR. Significant augmentation of pro-apoptotic gene therapy by pharmacologic bcl-xl down-regulation in mesothelioma. Cancer Gene Therapy. 2001; 8: 547-554.

301. Mol MJTM, de Rijke YB, Demacker PNM, Stalenhoef AFH. Plasma levels of lipid and cholesterol oxidation products and cytokines in diabetes mellitus and cigarette smoking: effects of vitamin E treatment. Atherosclerosis. 1997; 129: 169-176.

302. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. Hypertension. 1988; 12: 365-372.

303. Montonen J, Knekt P, Jarvinen R, Reunanen A. Antioxidant Intake and Risk of Type 2 Diabetes. Diabetes care. 2004; 27: 1836-1852.

304. Muià C, Mazzon E, Maiere D, Zito D,Di Paola R, Domenico S, Crisafulli C, Britti D, Cuzzocrea S. Pyrrolidine dithiocarbamate reduced experimental periodontitis European Journal of Pharmacology. 2006; 539: 205-210.

305. Munoz LE, van Bavel C, Franz S, Berden J, Herrmann M, van der Vlag J. Apoptosis in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. Lupus. 2008; 17; 371-375.

306. Murrell GAC, Phil D, Gongyao Tang G, Richard C, del Soldato P, Wang MX. Addition of nitric oxide through nitric oxide-paracetamol enhances healing rat achilles tendon. Clin Orthop Relat Res. 2008; 466: 1618-1624.

307. Muzio M, Chinnaiyan AM, Kishkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM. FLICE, A novel FADD-homologous ICE/CED-3–like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. Cell. 1996; 85: 817-827.

308. Nagano T. Bioimaging probes for reactive oxygen species and reactive nitrogen species. J Clin Biochem Nutr. 2009; 45: 111-124.

309. Nagareddy PR, Xia Z, McNeill JH, MacLeod KM. Increased expression of iNOS is associated with endothelial dysfunction and impaired pressor responsiveness in streptozotocin-induced diabetes. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005; 289: 2144-2152.

310. Nagata S, Golstein P. The fas death factor. Science New Series. 1995; 267:1449-1456.

311. Naka T, Nishimoto N, Kishimoto T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. Arthritis Res. 2002; 4: 233-242.

312. Neiva RF, Al-Shammari K, Nociti Jr FH, Soehren S, Wang H-L. Effects of vitamin-B complex supplementation on periodontal wound healing. J Periodontol. 2005; 76: 1084-1091.

313. Nesaretnam K, Dorasamy S, Darbre PD. Tocotrienols inhibit growth of ZR-75-1 breast cancer cells. International Journal of Food Sciences and Nutrition. 2000; 51: 95-103.

314. Niewczas MA, Ficociello LH, Johnson AC, Walker W, Rosolowsky ET, Roshan B, Warram JH, Krolewski AS. Serum concentrations of markers of TNFα and Fas-Mediated Pathways and Renal Function in Nonproteinuric Patients with Type 1 Diabetes. Clin J Am Soc Nephrol. 2009; 4: 62-70.

315. Nikolopoulos GK, Dimou NL, Hamodrakas SJ, Bagos PG. Cytokine gene polymorphisms in periodontal disease: A meta-analysis of 53 studies including 4178 cases and 4590 controls. J Clin Periodontol. 2008; 35: 754-767.

316. Nishida M, Grossi SG, Dunford RG, Ho AW, Trevisan M, Genco RJ. Dietary vitamin C and risk for periodontal disease. J Periodontol. 2000; 71: 1215-1223.

317. Nishimura F, Takahashi K, Kurihara M, Shogo Takashiba S, Murayama Y. Periodontal Disease as a Complication of Diabetes Mellitus. Ann Periodontol. 1998; 3: 20-29.

318. Norazlina M, Ima-Nirwana S, Gapor MTA, Khalid BAK. Tocotrienols are needed for normal bone calcification in growing female rats. Asia Pacific J Clin Nutr. 2002; 11: 194-199.

319. Norazlina M, Lee PL, Lukman HI, Nazrun AS, Ima-Nirwana S. Effects of vitamin E supplementation on bone metabolism in nicotine-treated rats. Singapore Med J. 2007; 48: 195-199.

320. Noxon SJ, King GJ, Gu G, Huang G. Osteoclast clearance from periodontal tissues during orthodontic tooth movement. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 2001; 120: 466-476.

321. Nunn ME. Understanding the etiology of periodontitis: an overview of Periodontal risk factors. Periodontology 2000. 2003; 32: 11-23.

322. O'Connell PAA, Taba M Jr, Nomizo A, Freitas MCF, Suaid FA, Uyemura SA, Trevisan GL, Novaes AB Jr, Souza SLS, Palioto DB, Grisi MFM. Effects of Periodontal therapy on glycemic control and inflammatory markers. J Periodontol. 2008; 79:774-783.

323. Oever IAM, Raterman HG, Nurmohamed MT, Simsek S. Endothelial Dysfunction, Inflammation, and Apoptosis in Diabetes Mellitus. Hindawi Publishing Corporation. Mediators of Inflammation. 2010; 2010: 1-15.

324. Oh TY, Yeoa M, Han SU, Cho YK, Kia YB, Chung MH, Kim YS, Cho SW, Hahm KB. Synergism of Helicobacter pylori infection and stress on the augmentation of gastric mucosal damage and its prevention with α-tocopherol. Free Radical Biology & Medicine. 2005; 38: 1447-1457.

325. Olmos A, Giner RM, Mánez S. Drugs modulating the biological effects of peroxynitrite and related nitrogen species. Med Res Rev. 2007; 27: 1-64.

326. Orrenius S. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. Toxicology Letters. 2004: 149: 19-23.

327. O'Keefe JH, Bell DSH, Wyne KL, Haffner SM. Diabetes Essentials. First edition. İstanbul. Bilim yayınları. 2006: 4-84.

328. Osakada F, Hashino A, Kume T, Katsuki H, Kaneko S, Akaike A. α-Tocotrienol provides the most potent neuroprotection among vitamin E analogs on cultured striatal neurons. Neuropharmacology. 2004; 47: 904-915.

329. Osawa Y, Nagaki M, Banno Y, Brenner DA, Nozawa Y, Moriwaki H, Nakashima S. Expression of the NF-*κ*B target gene X-ray-inducible immediate early response factor-1 short enhances TNF-α-induced hepatocyte apoptosis by inhibiting akt activation. The Journal of Immunology. 2003; 170: 4053-4060.

330. Otton R, Soriano FG, Verlengia R, Curi R. Diabetes induces apoptosis in Iymphocytes. Journal of Endocrinology. 2004; 182: 145-156.

331. Pae H-O, Lee YC, Jo E-K, Chung H-T. Subtle interplay of endogenous bioactive gases (NO, CO and H_2S) in inflammation. Arch Pharm Res. 2009; 32: 1155-1162.

332. Pan Z, Guzeldemir E, Toygar HU, Bal N, Bulut S. Nitric oxide synthase in gingival tissues of patients with chronic periodontitis and with and without diabetes. J Periodontol. 2010; 81: 109-120.

333. Panjamurthy K, Manoharan S, Ramachandran CR. Lipid peroxidation and antioxidant status patients with periodontitis. Cell Mol Biol Lett. 2005; 10: 255-264.

334. Paolisso G, D'Amore A, Giugliano D, Ceriello A, Varricchio M, D'Onofrio F. Pharmacologic doses of vitamin E improve insulin action in healthy subjects and non-insulin-dependent diabetic patients. Am J Clin Nutr. 1993; 57: 650-656.

335. Parrish JH, DeMarco TJ, Bissada NF. Vitamin E and periodontitis in the rat. Oral surg. 1977; augst: 210-218.

336. Parton M, Dowsett M, Ian Smith I. Studies of apoptosis in breast cancer. BMJ. 2001; 322: 1528-32.

337. Pastor MMC, López-Ibarra PJ, Escobar-Jiménez F, Pardo S, Garcia-Cervigon A. Intensive insulin therapy and bone mineral density in Type 1 diabetes mellitus: A Prospective Study. Osteoporos Int. 2000; 11: 455-459.

338. Papapanou PN, Neiderud A-M, Sandros J, Dahlén G: Interleukin-1 gene polymorphism and periodontal status. A case-control study. J Clin Periodontol. 2001; 28: 389-396.

339. Pawankar N, Okuda M, Yssel H, Okumura K, Ra C. Nasal mast cells in perennial allergic rhinitics exhibit increased expression of the FcεRI, CD40L, IL-4, and IL-13, and Can Induce IgE Synthesis in B Cells. J Clin Invest. 1997; 99: 1492-1499.

340. Pekiner BD, Evcimen ND, Ulusu NN, Bali M, Karasu Ç. Effects of vitamin E on microsomal Ca^{2+}-ATPase activity and calcium levels in streptozotocin-induced diabetic rat kidney. Cell Biochem Funct. 2003; 21: 177-182.

341. Petrova NL, Foster AVM, Edmonds ME. Calcaneal bone mineral density in patients with Charcot neuropathic osteoarthropathy: differences between Type 1 and Type 2 diabetes. Diabet. Med. 2005; 22: 756-761.

342. Pihlstrom BL. Periodontal risk assessment, diagnosis and treatment planning. Periodontology 2000. 2001; 25: 37-58.

343. Pinton P, Ferrari D, Di Virgilio F, Pozzan T, Rizzuto R. Molecular machinery and signaling events in apoptosis. Drug Dev Res. 2001; 52: 558-570.

344. Pittas AG, Dawson-Husghes B, Li T, Van Dam RM, Willett WC, Manson JE, Hu FB. Vitamin D and calcium intake in relation to type 2 diabetes in women. Diabetes Care. 2006; 29: 650-656.

345. Pongrakhananon V, Nimmannit U, Luanpitpong S, Rojanasakul Y, Chanvorachote P. Curcumin sensitizes non-small cell lung cancer cell anoikis through reactive oxygen species-mediated Bcl-2 downregulation. Apoptosis. 2010; 15: 574-585.

346. Popkov VL, Fil'chukova IA, Lapina NV, Galenko-Yaroshevskii VP, Dukhanin AS. Activity of nitric oxide synthase and concentration of nitric oxide end metabolites in the gingiva under experimental pathological conditions. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2005; 140: 391-393.

347. Pourova J, Kottova M, Voprsalova M, Pour M. Reactive oxygen and nitrogen species in normal physiological processes. Acta Physiol. 2010; 198: 15-35.

348. Punithavathi VR, Anuthama R, Prince PSM. Combined treatment with naringin and vitamin C ameliorates streptozotocin-induced diabetes in male Wistar rats. J Appl Toxicol. 2008; 28: 806-813.

349. Pussinen PJ, Laatikainen T, Alfthan G, Asikainen S, Jousilahti P. Periodontitis is associated with a low concentration of vitamin C in plasma. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 2003; 10: 897-902.

350. Ramanathan K, Anusuyadevi M, Shila S, Panneerselvam C. Ascorbic acid and α-tocopherol as potent modulators of apoptosis on arsenic induced toxicity in rats. Toxicology Letters. 2005; 156: 297-306.

351. Ray A, Huisman MV, Tamsma JT, Asten J, Bingen BO, Broeders EABJ, Hoogeveen ES, Hout F, Kwee VA, Laman B, Malgo F, Mohammadi M, Nijenhuis M, Rijkée M, Tellingen MM, Tromp M, Tummers Q, Vries L. The role of inflammation on atherosclerosis, intermediate and clinical cardiovascular endpoints in type 2 diabetes mellitus. European Journal of Internal Medicine. 2009; 20: 253-260.

352. Reher VGS, Zenobio EG, Costa FO, Reher P, Soares RV. Nitric oxide levels in saliva increase with severity of chronic periodontitis. J. Oral Sci. 2007; 49: 271-276.

353. Renehan AG, Booth C, Potten CS. Education and debate: What is apoptosis, and why is it important? BMJ. 2001; 322: 1536-1538.

354. Reznick AZ, Shehadeh N, Shafir Y, Nagler RM. Free radicals related effects and antioxidants in saliva and serum of adolescents with Type 1 diabetes mellitus. Archives of Oral Biology. 2006; 51: 640-648.

355. Rippin JD, Patel A, Belyaev ND, Gill GV, Barnett AH, Bain SC. Nitric oxide synthase gene polymorphisms and diabetic nephropathy. Diabetologia. 2003;46: 426-428.

356. Rix M, Andreassen H, Eskildsen P. Impact of peripheral neuropathy on bone density in patients with type 1 diabetes. Diabetes Care. 1999; 22:827-831.

357. Rizk M, Witte MB, Barbul A. Nitric oxide and wound healing. World J Surg. 2004; 28: 301-306.

358. Rodrigo R, Guichard C, Charles R. Clinical pharmacology and therapeutic use of antioxidant vitamins. Fundamental & Clinical Pharmacology. 2007; 21: 111-127.

359. Rosenkranz-Weiss P, Sessa WC, Milstien S, Kaufman S, Watson CA, Pober JS. Regulation of nitric oxide synthesis by proinflammatory cytokines in human umbilical vein endothelial cells. J. Clin. Invest. 1994. 93: 2236-2243.

360. Royack GA, a, Nguyen MP, Tong DC, Poot M, Oda D. Response of human oral epithelial cells to oxidative damage and the effect of vitamin E. Oral Oncology. 2000; 36: 37-41.

361. Sacco M, Pellegrini F, Roncaglioni MC, Avanzini F, Tognoni G, Nicolucci A. primary prevention of cardiovascular events with low-dose aspirin and vitamin E in type 2 diabetic patients. Diabetes Care. 2003; 26: 3264-3272.

362. Sadir S, Deveci S, Korkmaz A, Oter S. Alpha-tocopherol, beta-carotene and melatonin administration protects cyclophosphamide-induced oxidative damage to bladder tissue in rats. Cell Biochem Funct. 2007; 25: 521-526.

363. Safkan-Seppala B, Ainamo J. Periodontal conditions in insulin-dependent diabetes mellitus. J Clin Periodontol. 1992; 19: 24-29.

364. Safkan-Seppala B, Sorsa T, Tervahartiala T, Beklen A, Yrjo T. Konttinen. Collagenases in Gingival Crevicular Fluid in Type 1 Diabetes Mellitus. J Periodontol. 2006;77:189-194.

365. Sagoo P, Chan G, Larkin DFP, George AJT. Inflammatory cytokines induce apoptosis of corneal endothelium through nitric oxide. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2004; 45: 3964-3973.

366. Sainz RM, Mayo JC, Reiter RJ, Tan DX, Rodriguez C. Apoptosis in primary lymphoid organs with aging. Microsc Res Tech. 2003; 62: 524-539.

367. Saito T, Murakami M, Shimazaki Y, Matsumoto S and Yamashita Y. The extent of alveolar bone loss is associated with impaired glucose tolerance in Japanese men. J Periodontol. 2006; 77: 392-397.

368. Sakai T, Kiyoshima T, Kobayashi I, Moroi R, Ibuki T, Nagadome M, Terada Y, Sakai H. Age-dependent changes in the distribution of BrdU-and TUNEL-Positive cells in the murine gingival tissue. J Periodontol. 1999; 70: 973-981.

369. Sakuma H, Yamamoto M, Okumura M, Kojima T, Maruyama T, Yasuda K. High glucose inhibits apoptosis in human coronary artery smooth muscle cells by increasing bcl-xL and bfl-1/A1. Am J Physiol Cell Physiol. 2002; 283: 422-428.

370. Saldeen K, Saldeen T. Importance of tocopherols beyond a-tocopherol: evidence from animal and human studies. Nutr Res. 2005; 25: 877-889.

371. Salvi GE, Franco LM, Braun TM, Lee A, Rutger Persson G, Lang NP, Giannobile WV. Pro-inflammatory biomarkers during experimental gingivitis in patients with type 1 diabetes mellitus: a proof-of-concept study. J Clin Periodontol. 2010; 37: 9-16.

372. Santos VR, Ribeiro FV, Lima JA, Napimoga MH, Bastos MF, Duarte PM: Cytokine levels in sites of chronic periodontitis of poorly controlled and well-controlled type 2 diabetic subjects. J Clin Periodontol. 2010; 37: 1049-1058.

373. Saxlin T, Suominen-Taipale L, Leiviskä J, Jula A, Knuuttila M, Ylöstalo P. Role of serum cytokines tumour necrosis factor-α and IL-6 in the association between body weight and periodontal infection. J Clin Periodontol. 2009; 36: 100-105.

374. Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, Souza AP, Brito RB, Camargo LEA, Line SRP. Interleukin 10 gene promoter polymorphisms are associated with chronic periodontitis. J Clin Periodontol. 2004; 31: 443-448.

375. Schneider C. Chemistry and biology of vitamin E. Mol Nutr Food Res. 2005; 49: 7-30.

376. Schneir ML, Ramamurthy NS, Golub LM. Extensive degradation of recently synthesized collagen in gingiva of normal and streptozotocin-induced diabetic rats. J Dent Res. 1984; 63: 23-27.

377. Schumann DM, Maedlera K, Franklin I, Konrad D, Størling J, Böni-Schnetzlera M, Gjinovci A, Kurrer MO, Gauthier BR, Bosco D, Andres A, Berney T, Greterh M, Becherh B, Chervonsky AV, Halban PA, Mandrup-Poulsen T, Wollheim CB, Donath MY. The Fas pathway is involved in pancreatic β cell secretory function. Pnas. 2007; 104: 2861-2866.

378. Schwartz LM, Kosz L, Kay BK. Gene activation is required for developmentally programmed cell death. Proc Nati Acad Sci. 1990; 87: 6594-6598.

379. Schwartz Z, Goultschin J, Dean DD, Boyan BD. Mechanisms of alveolar bone destruction in periodontitis. Periodontology 2000. 1997;14: 158-172.

380. Sen CK, Khanna S, Roy S. Tocotrienols: Vitamin E beyond tocopherols. Life Sciences. 2006; 78: 2088-2098.

381. Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Money RA. Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes. Diabetes. 2002; 51: 3391-3399.

382. Seven A, Güzel S, Seymen O, Civelek S, Bolayırlı M, Uncu M, Burçak G. Effects of vitamin E suppşementation on oxidative stres in streptozotocin induced diabetic rats: Investigation of liver and plasma. Yousei Medical Journal. 2004; 45: 703-710.

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

384. Seymour RA, Preshaw PM, Thomason JM, Ellis JS, Steele JG: Cardiovascular diseases and periodontology. J Clin Periodontol. 2003; 30: 279-292.

385. Shah S, Gapor A, Sylvester PW. Role of caspase-8 activation in mediating vitamin E-İnduced apoptosis in murine mammary cancer cells. Nutrition and Cancer. 2003; 45: 236-246.

386. Sharma A, Kharb S, Chugh SN, Kakar R, Singh GP. Evaluation of oxidative stress before and after control of glycemia and after vitamin E supplementation in diabetic patients. Metabolism. 2000; 49: 160-162.

387. Sharma CGD, Pradeep AR. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies: a renewed paradigm in periodontal disease pathogenesis? J Periodontol. 2006; 77:1304-1313.

388. Shibata K, Warbington ML, Gordon BJ, Kurihara H, Van Dyke TE. Nitric oxide synthase activity in neutrophils from patients with localized aggressive periodontitis. J Periodontol. 2001; 72: 1052-1058.

389. Shimada Y, Komatsu Y, Ikezawa-Suzuki I, Tai H, Sugita N, Yoshie H. The effect of periodontal treatment on serum leptin, interleukin-6, and C-reactive protein. J Periodontol. 2010; 81: 1118-23.

390. Shimizu Y, Kataoka M, Seto H, Kido J-İ, Nagata T. Nifedipine induces gingival epithelial hyperplasia in rats through inhibition of apoptosis. J Periodontol. 2002; 73: 861-867.

391. Shin D-S, Park J-W, Suh J-Y, Lee J-M. The expressions of inflammatory factors and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 in human chronic periodontitis with type 2 diabetes mellitus. J Periodontal Implant Sci. 2010; 40:33-38.

392. Shingu C, Hagiwara S, Iwasaka H, Matsumoto S, Koga H, Yokoi I, Noguchi T. EPCK1, a vitamin C and E analogue, reduces endotoxin-induced systemic inflammation in mice. Journal of Surgical Research. 2010; 1016: 1-7.

393. Shirpoor A, Salami S, Khadem-Ansari MH, Ilkhanizadeh B, Pakdel FG, Khademvatani K. Cardioprotective effect of vitamin E: rescues of diabetes-induced cardiac malfunction, oxidative stress, and apoptosis in rat. Journal of Diabetes and Its Complications. 2009; 23: 310-316.

394. Shuid AN, Mehat Z, Mohamed N, Muhammad N, Soelaiman IN. Vitamin E exhibits bone anabolic actions in normal male rats. J Bone Miner Metab. 2010; 28:149-156.

395. Sia C, Hänninen A. Apoptosis in autoimmune diabetes: The fate of β-cells in the cleft between life and death. Rev Diabetic Stud. 2006; 3: 39-46.

396. Singh U, Jialal IA. Anti-inflammatory effects of α-tocopherol. Ann NY Acad Sci. 2004; 1031: 195-203.

397. Singh N, Armstrong DG, Lipsky BA. Preventing foot ulcers in patients with diabetes. JAMA. 2005; 293: 217-228.

398. Simon H-U, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. Apoptosis. 2000; 5: 415-418.

399. Sjöholm Å ,Berggren P-O, Cooney RV. γ -Tocopherol partially protects insulin-secreting cells against functional inhibition by nitric oxide. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2000; 277: 334-340.

400. Skyrme-Jones RAP, O'Brien RC, Berry KL, Meredith T. Vitamin E supplementation improves endothelial function in type I diabetes mellitus: A randomized, placebo-controlled study. JACC 2000; 36: 94-101.

401. Smaili SS, Hsu Y-T, Youle RJ, Russell JT. Mitochondria in Ca21 Signaling and Apoptosis. Journal of Bioenergetics and Biomembranes. 2000; 32: 35-46.

402. Smythe WR, Mohuiddin I, Ozveran M, Cao XX. Antisense therapy for malignant mesothelioma with oligonucleotides targeting the bcl-xl gene product. J Thorac Cardiovasc Surg. 2002; 123: 1191-1198.

403. Sobaniec H, Sobaniec-Lotowska M-E. Morphological examinations of hard tissues of paradontium and evaluation of selected processes of lipid peroxidation in blood serum of rats in the course of experimental periodontitis. Med Sci Monit. 2000; 6: 875-881.

404. Socransky SS, Haffajee AD, Microbiology of Periodontal Disease, In: Lindhe J, Karring T, Lang NP, editors. Clinical Periodontology and Implant Dentistry, fourth edition. Oxford: BlackwellMunksgaard, 2003; 106-150.

405. Soeta S, Higuchi M, Yoshimura I, Itoh R, nobuhiro Kimura N, Aamsaki H. Effects of vitamin E on the osteoblast differentiation. J. vet. med. sci. 2010; 72: 951-957.

406. Soheilykhah S, Mojibian M, Rashidi M, Rahimi-Saghand S, Jafari F. Maternal vitamin D status in gestational diabetes mellitus. Nutr Clin Pract. 2010; 25: 524-527.

407. Soini Y, Pääkkö P , Lehto V-P. Histopathological evaluation of apoptosis in cancer. AJP. 1998; 153: 1041-1053.

408. Soliman H, Craig GP, Nagareddy PR, Yuen VG, Lin G, Kumar U, John H. McNeill JH, MacLeod KM. Role of iNOS in Induction of RhoA Expression in Hearts from Diabetic Rats. 2008. Downloaded from cardiovascres.oxfordjournals.org at on June 16, 2010.

409. Splettstoesser WD, Schuff-Werner P. Oxidative stress in phagocytes- "The Enemy Within". Microsc Res Tech. 2002; 57: 441-455.

410. Spitaler MM, Graier WF. Vascular targets of redox signalling in diabetes mellitus. Diabetologia. 2002; 45: 476-494.

411. Srinath R, Acharya AB, Thakur SL. Salivary and gingival crevicular fluid melatonin in periodontal health and disease. J Periodontol. 2010; 81: 277-283.

412. SPSS. Statistical package for the Social Sciences. Version 17.0, Chicago, Illinois, USA, SPSS Inc, 2009.

413. Srinivasan S, Stevens M, Wiley JW. Diabetic peripheral neuropathy: Evidence for apoptosis and associated mitochondrial dysfunction. Diabetes. 2000; 49: 1932-1938.

414. Stashenko P, Fujiyoshi P, Obernesser MS, Prostak L, Haffajee AD, Socransky SS: Levels of interleukin lβ in tissue from sites of active periodontal disease. J Clin Periodontol 1991a; 18: 548-554.

415. Stashenko P, Jandinski JJ, Fujiyoshi P, Rynar J, Socransky SS. Tissue Levels of Bone Resorptive Cytokines in Periodontal Disease. J Periodontol. 1991b; 62: 504-509.

416. Stassi G, De Maria R, Trucco G, Rudert W, Testi R, Galluzzo A, Giordano C, Trucco M. Nitric oxide primes pancreatic β cells for fas-mediated destruction in insulin-dependent diabetes mellitus. J. Exp. Med. 1997; 186: 1193-1200.

417. Stehouwer CDA, Lambert J, Donker AJM, Hinsbergh VWM. Endothelial dysfunction and pathogenesis of diabetic angiopathy. Cardiovascular Research. 1997; 34: 55-68.

418. Steinberg HO, Brechtel G, Johnson A, Fineberg N, Baron AD. Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent. J. Clin. Invest. 1994; 94:1172-1179.

419. Stevens MJ, Lattimer SA, Kamijo M, Husyen CV, Sima AAF, Greene DA. Osmotically-induced nerve taurine depletion and the compatible osmolyte hypothesis in experimental diabetic neuropathy in the rat. Diabetologia. 1993; 36: 608-6143.

420. Stewart JE, Wager KA, Friedlander AH, Zadeh HH: The effect of periodontal treatment on glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus. J Clin Periodontol. 2001; 28: 306-310.

421. Stirban A, Rösen P, Tschoepe D. Complications of type 1 diabetes: New molecular findings. Mt Sinai J Med. 2008; 75: 328-351.

422. Struillou X, Boutigny H, Soueidan A and Layrolle P. Experimental animal models in periodontology: A review. The Open Dentistry Journal. 2010; 4: 37-47.

423. Størling J, Binzer J, Andersson AK, Züllig RA, Tonnesen M, Lehmann R, Spinas GA, Sandler S, Billestrup N, Mandrup-Poulsen T. Nitric oxide contributes to cytokine-induced apoptosis in pancreatic beta cells via potentiation of JNK activity and inhibition of Akt. Diabetologia. 2005; 48: 2039-2050.

424. Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF, Nathan CF. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: An FAD- and FMN-containing flavoprotein. Proc. Natl. Acad. Sci. 1991; 88: 7773-7777.

425. Suarez-Pinzon W, Sorensen O, Bleackley RC, Elliott JF, Rajotte RV, Rabinovitch A. Cell destruction in NOD mice correlates with Fas(CD95) expression on-cells and p roinflammatory cytokine expression in islets. Diabetes. 1999; 48: 21-28.

426. Suarez-Pinzon WL, Power RF, Rabinovitch A. Fas ligand-mediated mechanisms are involved in autoimmune destruction of islet beta cells in non-obese diabetic mice. Diabetologia. 2000; 43: 1149-1156.

427. Sun F, Iwaguchi K, Shudo R, Nagaki Y, Tanaka K, Ikeda K, Tokumary S, Kojo S. Change in tissue concentrations of lipid hydroperoxides, vitamin C and vitamin E in rats with streptozotocin-induced diabetes. Clinical Science. 1999; 96: 185-190.

428. Susztak K, Raff AC, Schiffer M, Böttinger EP. Glucose-Induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy. Diabetes. 2006; 55: 225-233.

429. Syrjälä A-MH, Ylöstalo P, Niskanen MC, Knuuttila MLE: Role of smoking and $HbA1_c$ level in periodontitis among insulin-dependent diabetic patients. J Clin Periodontol. 2003; 30: 871-875.

430. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. Physiol Res. 2001; 50: 536-546.

431. Takahashi A, Masuda A, Sun M, Centonze VE, Herman B. Oxidative stress-induced apoptosis is associated with alterations in mitochondrial caspase activity and Bcl-2-dependent alterations in mitochondrial pH (pHm). Brain Research Bulletin. 2004; 62: 497-504.

432. Tatsumi T, Matoba S, Kawahara A, Keira N, Shiraishi J, Akashi K, MD, Kobara M, MD, Tanaka T, Katamura M, Nakagawa C, Ohta B, Shirayama T, Takeda K, Asayama J, Fliss H, Nakagawa M. Cytokine-induced nitric oxide production inhibits mitochondrial energy production and impairs contractile function in rat cardiac myocytes. JACC. 2000; 35: 1338-1346.

433. Taylor GW. Bidirectional interrelationships between diabetes and periododntal diseases: An epidemiologic perspective. Ann Periodontol. 2001; 6: 99-112.

434. Taylor GW. The effects of periodontal treatment on diabetes. JADA. 2003; 134: 41-48.

435. Temple RC, Aldridge VA, Sampson MJ, Greenwood RH, Heyburn PJ, Glenn A. Impact of pregnancy on the progression of diabetic retinopathy in Type 1 diabetes. Diabet Med. 2001; 18: 573-577.

436. Tervonen T, Karjalainen K, Knuuttila M,Huumonen S: Alveolar bone loss in type 1 diabetic subjects. J Clin Periodontol. 2000; 27: 567-571.

437. Tervonen T, Lamminsalo S, Hiltunen L, Raunio T, Knuuttila M. Resolution of periodontal inflammation does not guarantee improved glycemic control in type 1 diabetic subjects. J Clin Periodontol. 2009; 36: 51-57.

438. Thomas HE, McKenzie MD, Angstetra E, Camphell PD, Kay TW. Beta cell apoptosis in diabetes. Apoptosis. 2009; 14: 1389-1404.

439. Thomson A. The cytokine handbook. Third edition, California, Academic Press, 1998: 35-227.

440. Thorburn A. Death receptor-induced cell killing. Cellular Signalling. 2004; 16: 139-144.

441. Thunell DH, Tymkiw KD, Johnson GK, Joly S, Burnell KK, Cavanaugh JE, Brogden KA, Guthmiller JM. A multiplex immunoassay demonstrates reductions in gingival crevicular fluid cytokines following initial periodontal therapy. J Periodont Res. 2010; 45: 148-152.

442. Timimi FK, Ting HH, Haley EA, Roddy MA, Ganz P, Creager MA. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. J Am Coll Cardiol. 1998; 31; 552-557.

443. Timmer T, De Vries EGE, De Jong S. Fas receptor-mediated apoptosis: a clinical application? J Pathol 2002; 196: 125-134.

444. Ting HH, Timimi FK, Boles KS, Creager SJ, Ganz P, Creager MA. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with non–insulin-dependent diabetes mellitus. J Clin Invest. 1996. 97: 22-28.

445. Tits LJ, Demacker PN, Graaf J, Hak-Lemmers HL, Stalenhoef AF. α-Tocopherol supplementation decreases production of superoxide and cytokines by leukocytes ex vivo in both normolipidemic and hypertriglyceridemic individuals. Am J Clin Nutr 2000; 71: 458-464.

446. Toker H, Özdemir H, Eren K, Özer H, and Şahin G. N-Acetylcysteine, a thiol antioxidant, decreases alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. J Periodontol. 2009; 80: 672-678.

447. Tomofuji T, Ekuni D, Irie K, Azuma T, Endo Y, Tamaki N, Sanbe T, Murakami J, Yamamoto T, Morita M. Preventive effects of a cocoa-enriched diet on gingival oxidative stress in experimental periodontitis. J Periodontol. 2009; 80: 1799-1808.

448. Trevilatto PC, Tramontina VA, Machado MAN, Gonçalves RB, Sallum AW, Line SRP. Clinical, genetic and microbiological findings in a Brazilian family with aggressive periodontitis. J Clin Periodontol. 2002; 29: 233-239.

449. Tronchini EA, Neto MHM, Zanoni JN. Vitamin E (α-tocopherol) supplementation enhances nitric oxide production in penile tissue. Bju International. 2010; 106; 1788-1793.

450. Tsai C, Hayes C, Taylor GW. Glycemic control of type 2 diabetes and severe periodontal disease in the US adult population. Community Dent Oral Epidemiol. 2002; 30: 182-192.

451. Tunalı M. Deneysel diyabet oluşturulan ratların periodontal dokularında apoptozisin in situ olarak incelenmesi. Doktora tezi, Konya, Selçuk üniversitesi sağlık bilimleri enstitüsü, 2005.

452. Upritchard JE, Sutherland WHF, Mann JI. Effect of supplementation with tomato juice, vitamin E, and vitamin C on LDL oxidation and products of inflammatory activity in type 2 diabetes. Diabetes Care. 2000; 23: 733-738.

453. Väisänen-Tommiska MRH. Nitric oxide in the human uterine cervix: Endogenous ripening factor. Annals of Medicine. 2008; 40: 45-55.

454. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. IJBCB. 2007; 39: 44-84.

455. Van der Zee E, Eyerts V, Beertsen W. Cytokines modulate routes of collagen breakdown. Review with special emphasis on mechanisms of collagen degradation in the periodontium and the burst hvpothesis of periodontal disease progression. J Clin Periodontol. 1997: 24: 297-305.

456. Vega-Lopez S, Kaul N, Devaraj S, Cai RY, German B, Jialal I. Supplementation with ω3 polyunsaturated fatty acids and all-rac alpha-tocopherol alone and in combination failed to exert an anti-inflammatory effect in human volunteers. Metabolism. 2004; 53: 236-240.

457. Venkatraman JT, Chu W. Effects of dietary ω-3 and ω-6 lipids and vitamin E on serum cytokines, lipid mediators and anti-DNA antibodies in a mouse model for rheumatoid arthritis. Journal of the American College of Nutrition. 1999; 18: 602-613.

458. Venza I, Visalli M, Cucinotta M, De Grazia G, Teti D, Venza M. Proinflammatory gene expression at chronic periodontitis and peri-implantitis sites in patients with or without Type 2 diabetes. J Periodontol. 2010; 81: 99-108.

459. Viana M, Herrera E, Bonet B. Teratogenic effects of diabetes mellitus in the rat. Prevention by vitamin E. Diabetologia. 1996; 39: 1041-1046.

460. Viana M, Castro Mi Barbars C, Herrera E. Effect of different doses of vitamin E on the incidence of malformations in pregnant diabetic rats. Ann Nutr Metab. 2003;47: 6-10.

461. Vieira H, Kroemer G. Mitochondria as targets of apoptosis regulation by nitric oxide. IUBMB Life. 2003; 55: 613-616.

462. Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. Endocrine Reviews. 2004; 25: 612-628.

463. Vincent AM, McLean LL, Backus C, Feldman EL. Short-term hyperglycemia produces oxidative damage and apoptosis in neurons. The Faseb Journal. 2005; 1096: 1-24.

464. Vinik AI, Vinik E. Prevention of the complications of diabetes. Am J Manag Care. 2003; 9: 63-80.

465. Wan Nazaimoon WM, Khalid BAK. Tocotrienols-rich diet decreases advanced glycosylation endproducts in non-diabetic rats and improves glycemic control in streptozotocin-induced diabetic rats. Malaysian J Pathol. 2002; 24: 77-82.

466. Watanebe K, Petro BJ, Shlimon AE, Unterman TG. Effect of Periodontitis on Insulin Resistance and the Onset of Type 2 Diabetes Mellitus in Zucker Diabetic Fatty Rats. J Periodontol. 2008; 79: 1208-1216.

467. Watts GF, Playford DA. Dyslipoproteinaemia and hyperoxidative stress in the pathogenesis of endothelial dysfunction in non-insulin dependent diabetes mellitus: an hypothesis. Atherosclerosis. 1998; 141: 17-30.

468. Wautier J-L, Wautier M-P, Schmidt A-M, Anderson GM, Hori O, Zoukourian C,Capron L, Chappey O, Yan S-D, Brett J, Guillausseau P-J, Stern D. Advanced glycation end products (AGEs) on the surface of diabetic erythrocytes bind to the vessel wall via a specific receptor inducing oxidant stress in the vasculature: A link between surfaceassociated AGEs and diabetic complications. Proc Natl Acad Sci. 1994; 91: 7742-7746.

469. Weinberg MA, Bral M. Laboratory animal models in periodontology J Clin Periodontol. 1999; 26: 335-340.

470. West IC. Radicals and oxidative stress in diabetes. Diabetes Med. 2000; 17: 171-180.

471. Wirthlin MR, Marshall GW, Rowland RW. Formation and decontamination of biofilms in dental unit watwrlines. J Periodontol. 2003; 74: 1595-1609.

472. Wogensen L, Lee M-S, Sarvetnick N. Production of interleukin 10 by islet cells accelerates immune-mediated destruction of 3 cells in nonobese diabetic mice. J. Exp. Med. 1994; 179: 1379-1384.

473. Wolf RL, Cauley JA, Pettinger M, Jackson R, Lacroix A, Leboff MS, Lewis CE, Nevitt MC, Simon JA, Stone KL, Wactawski-Wende J. Lack of a relation between vitamin and mineral antioxidants and bone mineral density: results from the Women's Health Initiative. Am J Clin Nutr. 2005; 82: 581-588.

474. Wolf HF, Rateitschak KH. Periodontoloji. Third edition, Ankara, Palme yayıncılık. 2007: 47-50.

475. Woo M-H, Park S, Woo J-T, Choue R. A comparative study of diet in good and poor glycemic control groups in elderly patients with type 2 diabetes mellitus. Korean Diabetes J. 2010; 34: 303-311.

476. Wood N, Johnson RB. The relationship between tomato intake and congestive heart failure risk in periodontitis subjects. J Clin Periodontol. 2004; 31: 574-580.

477. Wu JHY, Ward NC, Indrawan AP, Almeida C-A, Hodgson JM, Proudfoot JM, PuddeyIB, Croft KD. Effects of α-tocopherol and mixed tocopherol supplementation on markers of oxidative stres and inflammation in type 2 diabetes. Clinical Chemistry. 2007; 53: 511-519.

478. Wu T-G, Li W-H, Lin Z-Q, Wang L-X. Effects of folic acid on cardiac myocyte apoptosis in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. Cardiovasc Drugs Ther. 2008; 22: 299-304.

479. Wyllie AH. Apoptosis (The 1992 Frank Rose Memorial Lecture). Br J Cancer. 1993; 67: 205-208.

480. Xie K, Huang S , Wang Y, Beltran PJ, Juang S-H, Dong Z, Reed JC, McDonnell TJ, McConkey DJ, Fidler IJ. Bcl-2 protects cells from cytokine-induced nitric-oxide-dependent apoptosis. Cancer Immunol Immunother. 1996; 43: 109-115.

481. Xu Y, Toobert D, Savage C, Pan W, Whitmer K. Factors influencing diabetes self-management in Chinese people with Type 2 diabetes. Research in Nursing & Health. 2008; 31: 613-625.

482. Yamazaki K, Nakajima T, Hara K. Immunohistological analysis of T cell functional subsets in chronic inflammatory periodontal disease Clin Exp Immunol. 1995; 99:384-391.

483. Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, Pinsky D, Stern D. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. The Journal of Biological Chemistry. 1994; 269: 9889-9897.

484. Yang X, Borg LAH, Siman CM, Eriksson UJ. Maternal antioxidant treatments prevent diabetes-induced alterations of mitochondrial morphology in rat embryos. The Anatomical Record. 1998; 251:303-315.

485. Yu W-J, Juang S-W, Chin W-T, Chi T-C, Wu T-J, Cheng J-T. Decrease of nitric oxide synthase in the cerebrocortex of streptozotocin-induced diabetic rats. Neuroscience Letters. 1999; 272: 99-102.

486. Yoon Y, Song J, Ho Hong S, Q Kim J. Plasma nitric oxide concentrations and nitric oxide synthase gene polymorphisms in coronary artery disease. Clinical Chemistry. 2000; 46; 1626-1630.

487. Yoshida A, Takemura H, Inoue H, Miyashita T, Ueda T. Inhibition of glutathione synthesis overcomes Bcl-2-mediated topoisomerase inhibitor resistance and induces nonapoptotic cell death via mitochondrial-independent pathway. Cancer Res. 2006; 66: 5772-5780.

488. Young LD, Yu D, Bateman RM, Brock GB. Oxidative stress and antioxidant therapy: Their impact in diabetes-associated erectile dysfunction. J Androl. 2004; 25: 830-836.

489. Yuan J, Murrell GAC, Wei A-Q, Appleyard RC, Del Soldato P, Wang M-X. Addition of nitric oxide via nitroflurbiprofen enhances the material properties of early healing of young rat Achilles tendons. Inflamm Res. 2003; 52: 230-237.

490. Zaken V, Kohen R, Ornoy A. Vitamins C and E improve rat embryonic antioxidant defense mechanism in diabetic culture medium. Teratology. 2001; 64: 33-44.

491. Zella JB, DeLuca HF. Vitamin D and autoimmune diabetes. Journal of Cellular Biochemistry. 2003; 88: 216-222.

492. Zhang BX, Brunner T, Carter L, Dutton RW, Rogers P, Bradley L, Sato T, Reed JC, Green D, Swain SL. Unequal death in T helper cell (Th)1 and Th2 effectors: Th1, but not Th2, effectors undergo rapid Fas/FasL-mediated apoptosis. J Exp Med. 1997; 185: 1837-1849.

493. Zhang J, Xu M. Apoptotic DNA fragmentation and tissue homeostasis. TRENDS in Cell Biology. 2002; 12: 84-89.

494. Zhang Y, Peng T, Zhu H, Zheng X, Zhang X, Jiang N, Cheng X, Lai X, Shunnar A, Singh M, Riordan N, Bogin V, Tong N, Min W-P. Prevention of hyperglycemia-induced myocardial apoptosis by gene silencing of Toll-like receptor-4. Journal of Translational Medicine. 2010; 133: 1-8.

495. Zimmerman MA, Flores SC. Autoimmune-Mediated oxidative stress and endothelial dysfunction: Implications of accelerated vascular injury in Type I diabetes. Journal of Surgical Research. 2009; 155: 173-178.

496. Zipris D, Karnieli E. A single treatment with IL-4 via retrovirally transduced lymphocytes partially protects against diabetes in BioBreeding (BB) rats. JOP J Pancreas. 2002; 3: 76-82.

497. Zobalı F, Avcı A, Canbolat O, Karasu Ç. Effect of vitamin A and insulin on the antioxidative state of diabetic rat heart: a comparison study with combination treatment. Cell Biochem Funct. 2002; 20: 75-80.

10. ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Alanya'da doğdu. İlköğrenimini Barbaros Azakoğlu İlkokulu'nda, ortaöğrenimini Özel Hamdullah Emin Paşa Lisesi'nde, lise öğrenimini Özel Alanya Fen Lisesi'nde tamamladı. 2001 yılında başladığı Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesinden 2006 yılında mezun oldu. Aynı yıl Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Periodontoloji Anabilim Dalı'nda doktora programına başladı. Halen aynı Anabilim Dalında doktora öğrencisi olarak görev yapmaktadır.