T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DENEYSEL PERİODONTİTİSLİ SIÇANLARDA ALFA-TOKOFEROL VE SODYUM SELENİT UYGULAMASININ SERUM SİTOKİN DÜZEYLERİ VE DİŞETİ iNOS VE CD95 EKSPRESYON DÜZEYLERİNE ETKİLERİ

Nurgül BAŞ

DOKTORA TEZİ

PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Nilgün Özlem ALPTEKİN

KONYA-2010

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DENEYSEL PERİODONTİTİSLİ SIÇANLARDA ALFA-TOKOFEROL VE SODYUM SELENİT UYGULAMASININ SERUM SİTOKİN DÜZEYLERİ VE DİŞETİ iNOS VE CD95 EKSPRESYON DÜZEYLERİNE ETKİLERİ

Nurgül BAŞ

DOKTORA TEZİ

PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Nilgün Özlem ALPTEKİN

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 09102032 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2010

ii. ÖNSÖZ

Doktora eğitimim süresince verdiği maddi destekten dolayı TÜBİTAK'a;

Projemizi desteklediği için Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'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. Selçuklu Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Zeliha Füsun Baba, S.Ü. Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yard. 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 S. Hakkı'ya

Hayatım boyunca her zaman desteklerini hissettiğim aileme;

Hiçbir zaman yardımını esirgemeyen dostum Dr. Dt. L. Nisa Uygun'a ve anabilim dalındaki asistan arkadaşlarıma;

Teşekkürlerimi sunarım.

iii. İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE ve KISALTMALAR.....v
1.GİRİŞ.....1
1.1. Periodontal Hastalık.....1
1.2. Sitokinler.....3
1.2.1. İnterlökin-1.....5
1.2.2. İnterlökin-4.....6
1.2.3. İnterlökin-6.....7
1.2.4. Periodontal Hastalık ve Serum Sitokin Seviyeleri.....7
1.3. Serbest Radikaller.....8
1.3.1. Reaktif Oksijen Türleri ve Reaktif Nitrojen Türleri.....9
1.3.2. Reaktif Oksijen Türleri ve Doku Hasarı.....9
1.3.3. Reaktif Oksijen Türleri ve Nötrofiller.....10
1.3.4. Reaktif Oksijen Türleri ve Periodontal Hastalık.....11
1.3.5. Nitrik Oksit ve Nitrik Oksit Sentaz.....12
Nitrik Oksit, Nitrik Oksit Sentaz, Enfeksiyon ve Enflamasyon.....13
Nitrik Oksit, Nitrik Oksit Sentaz ve Sitokinler.....13
Nitrik Oksit, Nitrik Oksit Sentaz ve Periodontal Hastalık.....14
1.4. Apoptozis..... 14
1.4.1. Apoptozis ve Nekroz.....15
1.4.2. Apoptozis Yolakları.....16
CD95.....16
CD95L.....17
CD 95 İlişkili Apoptozis Yolağı.....18
1.4.3. Apoptozis ve Reaktif Oksijen Türleri.....19
1.4.4. Apoptozis ve Nitrik Oksit, Nitrik Oksit Sentaz.....19
1.4.5. Apoptozis ve Periodontal Hastalık.....20
1.5. Antioksidanlar.....21
1.5.1. Selenyum.....22
Selenyumun Kollajen Kaybına Etkisi.....26
Selenyumun Sitokin Düzeylerine Etkisi.....26
Selenyumun iNOS Ekspresyonuna Etkisi.....27
Selenyumun Apoptotik Hücre Ölümüne Etkisi.....27

1.5.2. Alfa-Tokoferol.....28
Alfa-Tokoferol'ün Kollajen Kaybına Etkisi.....32
Alfa-Tokoferol'ün Sitokin Düzeylerine Etkisi.....33
Alfa-Tokoferol'ün iNOS Ekspresyonuna Etkisi.....33
Alfa-Tokoferol'ün Apoptotik Hücre Ölümüne Etkisi.....34
1.5.3. Selenyum ve Alfa-tokoferol'ün Kombine Kullanımları.....35
1.5.4. Antioksidan-Antienflamatuvar Ajanların Deneysel Periodontitis Tedavisinde Kullanımı.....35

2. GEREÇ ve YÖNTEM.....38
2.1. Deneysel Hayvanlar.....38
2.2. Çalışma Dizaynı.....38
2.3. Histolojik ve İmmünohistokimyasal Değerlendirme.....40
2.3.1. Dokuların Hazırlanışı.....40
2.3.2. İmmünohistokimyasal İnceleme.....40
2.3.3. Parametrelerin Değerlendirilmesi.....41
2.4. Biyokimyasal Analiz.....42
2.4.1. Serum IL-1β Düzeylerinin Belirlenmesi.....42
2.4.2. Serum IL -6 Düzeylerinin Belirlenmesi.....43
2.4.3. Serum IL -4 Düzeylerinin Belirlenmesi.....43
2.5. Verilerin İstatistiksel Analizi.....44

3. BULGULAR.....45
4. TARTIŞMA.....57
4.1. Deneysel Çalışma Modeli.....57
4.2. Alveoler Kemik Kaybı.....58
4.3. Kollajen Lif Sayısı.....59
4.4. Serum Sitokin Konsantrasyonları.....60
4.5. iNOS Pozitif Boyanan Hücre Sayısı.....61
4.6. CD95 Pozitif Boyanan Hücre Sayısı.....63
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....65
6. ÖZET.....67
7. SUMMARY.....68

8. KAYNAKLAR.....69
9. EKLER.....86
EK-A: Etik Kurul Kararı.....86
10. ÖZGEÇMİŞ.....87

iv. SİMGE ve KISALTMALAR

A. Actinomycetemcomitans: Aggregatibacter actinomycetemcomitans

AKK: Alveoler kemik kaybı

AIF: Apoptozis indükleyici faktör "apoptosis inducing factor"

α-T: Alfa-tokoferol

C. rectus: Campylobacter rectus

DOS: Dişeti oluğu sıvısı

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

Fas: CD95

F. nucleatum: Fusobacterium nucleatum

IFN: İnterferon

iNOS: Uyarılabilir nitrik oksit sentaz "inducible nitric oxide synthase"

JNKs: c-Jun N- terminal kinazlar

IL: İnterlökin

IP: İntra peritonal

GPX: Glutatyon peroksidaz

HSP: Isıl şok protein, "heat shock protein"

H. pylory: Helicobacter pylory

LPS: Lipopolisakkarit

MAPK: Mitojen aktive edici kinaz "mitogen activated protein kinase"

Min-Maks: Minumum-Maksimum

MMP: Matriks metalloprotenaz

NO: Nitrik oksit "nitric oxide"

NOS: Nitrik oksit sentaz "nitric oxide synthase"

NFκB: Nükleer Faktör κB

Ort: Ortalama

PBS: Fosfatla tamponlanmış solusyon, "Phosphate buffered saline"

PMNL: Polimorfo nükleer lökosit

P. gingivalis: Porphyromonas gingivalis

P. intermedia: Prevotella intermedia

PG: Prostaglandin

RNT: Reaktif nitrojen türleri "reactive nitrogen species"

ROT: Reaktif oksijen türleri “reactive oxygen species”

SOD: Süperoksit dismutaz

Se: Sodyum selenit

SelP: Selenoprotein

Ss: Standart sapma

T. forsythia: Tannerella forsythia

Th*:* T yardımcı “ helper”

TGF: Transforming büyüme faktörü “transforming growth factor”

T. denticola: Treponema denticola

TNF: Tümör nekroz faktör

1. GİRİŞ

1.1. Periodontal Hastalık

Periodontitis dişetinde enflamasyon, periodontal doku yıkımı ve alveoler kemik kaybı ile karakterize, patogenezinde mikrobiyal dental plağın rol oynadığı kronik enflamatuvar bir hastalıktır (Novak 2009). Dişeti iltihabı "gingivitis" diş ve dişeti arasına yerleşen biyofilm sonucunda geri dönüşümlü enflamatuvar reaksiyonları içerirken, periodontitiste dirençli bakteriyel enfeksiyona karşı geri dönüşümsüz yıkımlar meydana gelir. Periodontitis, gingivitis ile başlayabilir, ancak, bütün gingivitis lezyonları periodontitise dönüşmeyebilir (Listgarten 1986). Klinik ataşman ve alveolar kemik kaybı, periodontal cep oluşumu ve gingival enflamasyon periodontitisin temel klinik özellikleridir. Ayrıca, dişetinde büyüme ya da çekilme, sondlamada kanama, mobilite ve dişin kaybı söz konusu olabilir. Birleşim epitelinin mine-sement sınırından apikale göçü, periodontal cep formasyonu, kollajen lif ve alveoler kemik kaybı, birleşim ve cep epitelinde çok sayıda nötrofil ve plazma hücreleri, lenfositler ve makrofajlarla birlikte yoğun enflamatuvar hücre infiltrasyonu periodontitisin histopatolojik özellikleridir (Flemming 1999). Literatürde, 1980'li yıllarda periodontitisin enfeksiyöz karakteri üzerinde durulurken, 1990'lardan sonra periodontitisin oluşması için sadece bakteri varlığının yeterli olmadığı metabolik hastalıklar, sigara kullanımı gibi konakla ilgili kazanılmış, çevresel ve genetik faktörlerin rol oynadığı "multifaktoriyel" bir hastalık olduğu ortaya konmuştur (Page ve Kornman 1997, Kornman 2008).

Bakteriyel biyofilm bütün sert ve yumuşak dokular üzerinde oluşur ve çürük, periodontal hastalık gibi problemlerin temel etiyolojik ajanıdır (Bernimoulin 2003). Periodontitisli bölgelerde sürekli olarak bulunan şüpheli periodontopatojenler dar bir gram negatif mikroorganizma profili oluşturur. Bunlar *Porphyromonas gingivalis (P. gingivalis), Tannerella forsythia (T. forsythia), Prevotella intermedia (P. intermedia), Campylobacter rectus (C. rectus), Fusobacterium nucleatum (F. nucleatum), Aggregatibacter actinomycetemcomitans (A. actinomycetemcomitans)* ve *Treponema denticola (T. denticola)'*dır (Academy Report 2005). Bu mikroorganizmaların konak savunması üzerine bazı yıkıcı etkileri vardır. *Porphyromonas gingivalis* dişeti epitel hücrelerini ve monositleri aktive ederek

“İnterlökin” (IL-1), IL-6, IL-8 ve “Tümör nekroz faktör” (TNF)-α üretimine neden olur (Amano 2003). Bir diğer virülans faktörü olan “gingipain”ler de fibroblastlardaki latent metalloproteinazların sentezini arttırır (Imamura 2003). *Tannerella forsythia* apoptozis belirteçlerinden olan kaspaz-3’ü aktive eder (Holt ve Ebersole 2005). Bu özelliği ile epitel hücreleri, gingival fibroblastlar (Tanner ve Izard 2006) ve konak savunma hücrelerini yok eder (Holt ve Ebersole 2005). *Prevotella intermedia*’nın ürettiği proteazlar da birçok doku, doku sıvısı ile fibrinojen, kollajen ve fibronektin gibi proteinleri yıkma yeteneğindedir (Eley ve Cox 2003). *Camphylobacter rectus* IL-1, TNF-α gibi proenflamatuvar sitokinlerin sentezini arttırır (Thompson 2002). Olgun dental plak ve gingivitisin başlangıcında yer alan *F. nucleatum*, gingivitis lezyonlarının periodontitise dönüşmesinde de varlığını sürdürür. (Roques ve ark 2000). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*’ın ürettiği lökotoksin, lipopolisakkarit (LPS), “kemik rezorpsiyon indükleyici toksin”, asit ve alkalen fosfataz ve kollajenaz ile doku yıkımına neden olur (Zambon 1985). Şiddetli periodontal hastalığın bulunduğu bölgelerde sıklıkla tespit edilen *T. denticola’*nın (Takeuchi ve ark 2001) yapısındaki “cystalysin” memeliler için önemli bir antioksidan olan glutatyonu yıkabilmektedir (Holt ve Ebersole 2005).

Bakteriler doğrudan “direkt” ve dolaylı olarak “indirekt” yollarla dokuda yıkım yaparlar. Hastalığın erken aşamalarından itibaren bakteriler, direkt patolojik etkileri ve ürettikleri maddelerle patogenezde önemli rol oynarlar. Periodonsiyumun temel savunma sisteminin bakterilerin etkisiyle bozulması konakla ilişkili yıkım mekanizmalarını ve böylece bakterilerin dolaylı etkilerini ortaya çıkarır (Informational Paper 1999).

Nötrofiller periodontal patojenlerin kontrolünde önemli rol oynar ve enflamasyon bölgesine ilk gelen lökositlerdir. Birleşim epiteli ve dişeti oluğundaki en baskın hücre tipidir. Bakteriyel enfeksiyonların kontrolü için transendotelyal migrasyon, kemotaksis, transepitelyal migrasyon, opsonizasyon, fagositoz ve intrafagolizozomal öldürme fonksiyonlarının tam olması gereklidir. Nötrofil fonksiyonlarındaki bozukluklar hem süt hem de sürekli dişlerde şiddetli periodontal yıkıma neden olur (Nisengard ve ark 2009). Nötrofiller, “oksijene bağlı” oksidatif patlama sonucunda serbest radikal oluşumu ve “oksijenden bağımsız olarak” stoplazmik primer ve sekonder granüllerin degranülasyonu aracılığıyla fagolizozom

içine enzimlerin bırakılması olmak üzere iki ayrı sistemle bakterileri öldürürler (Van Dyke ve ark 2005). Nötrofillerin solunumsal patlaması sonucunda açığa çıkan ürünler ve degranulasyon olarak adlandırılan olayda granüller içindeki proteolitik enzimler konağı bakteriyel invazyondan korumasına rağmen kontrolsüz olduğunda doku yıkımına neden olarak periodontitis patogenezinde rol oynayabilir (Deas ve ark 2003).

Akut enflamatuvar cevapta baskın hücre tipi nötrofiller olmasına, dental plağın diş yüzeyine yerleşmesinden 4-7 gün sonra bağdokudaki kollajenin %70'den fazlası kaybolmasına, ve bağdokusu yıkılmaya devam etmesine karşın henüz alveoler kemikte bir yıkım yoktur (Schwartz ve ark 1997). Enflamasyonda kemik kaybı olup olmayacağı dişetindeki enflamatuvar belirteçlerin belli düzeylere ulaşmasına ve bu belirteçlerin alveol kemiğe ulaşabilecek mesafede dişeti dokularına penetre olmasına bağlıdır. İnterlökin-1, IL-6, IL-11, IL-17 ve TNF-α gibi proenflamatuvar sitokinler kritik konsantrasyonlara ulaşarak alveoler kemik kaybını başlatır. Diğer taraftan antienflamatuvar özellikleri bilinen IL-4, IL-10, IL-12, IL-13, IL-18, "İnterferon" (IFN)-β ve IFN-γ gibi sitokinler kemik kaybını baskılayarak tam ters etki gösterirler (Cochran 2008).

1.2. Sitokinler

Sitokinler düşük molekül ağırlıklı, doğal ve kazanılmış immün cevapta hücrelerin büyümesi ve farklılaşması, enflamasyon ve tamir süreçlerine dahil olan çözülebilir protein habercileridir (Doan ve ark 2008). Birçok farklı hücreden sentezlenirler, birden fazla hücre üzerinde etki gösterirler (Erganiş&İstanbulluoğlu 1993), genellikle lokal olarak oluşturulurlar; hormonlar gibi endokrin etki göstermezler, son derece aktiftirler, salgılandıkları hücreyi etkileyerek otokrin etki de gösterebilirler (Yeğin 1992).

Bakteriler veya onların ürünleri gingival dokulara ulaşarak nötrofil, lenfosit, makrofaj ve mast hücrelerinin infiltrasyonu ile karakterize enflamatuvar cevaba neden olur. Makrofajlar periodontal enfeksiyonlar sırasında üretilen birçok faktör tarafından uyarılırlar. Makrofaj aktivasyonu ile kemik yıkımına neden olan IL-1α ve β, TNF-α, IL-6 ve kollajeni yıkan "matriks metalloprotenaz" ların (MMP) üretimi

gerçekleşir. Özellikle *A. actinomycetemcomitans* ve *P. gingivalis* gibi birkaç periodontopatojen kollajenazı da içeren MMP üretmelerine rağmen bu proteinazlar hastalığın ilerlemesiyle ilgili temel yıkım enzimleri değildirler. Endojen olarak üretilen MMP'ler doku yıkımından birinci derecede sorumludurlar. Metalloproteinazların doku inhibitörleri "tissue inhibitor matrix metalloproteinases" dokuda metalloproteinaz inhibitörlerinin büyük grubunu oluşturur. Bağ doku hücreleri; sitokinler, büyüme faktörleri ve hormonların kompleks etkileşimi sonucunda metalloproteinazlar ve metalloproteinaz inhibitörlerinin ekspresyonunu düzenler. Örneğin, IL-1 kemik yıkımını başlatıp eikosanoid sentezini arttırır, IL-10 ise MMP'leri azaltıp metalloproteinaz doku inhibitörü-1'i arttırır. (Reynold ve ark 1997, De Nardin 2001, Academy Report 2002, Giannobile 2008). Lenfotoksin, "interferon gamma" (IFNγ), "koloni stimüle edici faktör", prostaglandin (PG)E'ler ve diğer araşidonik asit metabolitleri de çeşitli yollarla kemik yıkımına katkıda bulunurlar (Schwartz ve ark 1997).

Kronik enflamatuvar bir hastalık olan periodontitiste baskın hücre tipi B lenfositlerken, gingivitis lezyonlarındaki baskın hücre tipi T lenfositlerdir (Yamazaki ve ark 2003). Periodontitisle ilgili çalışmalar T lenfositler üzerine yoğunlaşmıştır (Seymour ve Gemmell 2001). T yardımcı "helper" (Th) hücreleri enflamasyon ve otoimmün hastalıklarda kritik bir role sahiptir (Kramer ve Gaffen 2007). Bu hücreler iki büyük alt grup olan hücresel immüniteden sorumlu Th1 ve humoral immüniteden sorumlu Th2 hücrelerine dönüşebilir (Taubman ve ark 2005). Enfeksiyonlardaki immün cevap Th1 ve Th2 hücrelerinin sitokinleri arasındaki denge ile sağlanır (Gemmell ve Seymour 2004). Klinik olarak insanlar ve hayvanlar üzerinde yürütülen çalışmalar Th1, Th2, Th17 (düzenleyici) ve bunların ürettiği sitokinlerin sıklıkla enfekte periodontal dokularda bulunduğunu göstermektedir (Baker ve ark 1999, Teng 2003). Tyardımcı1 hücrelerinin sıçandaki periodontal kemik rezorpsiyonu modelinde kemik yıkımını arttırabildiği gösterilmiştir, Th2 hücreleri aynı etkiyi yapmamıştır (Kawai ve ark 2000). Tyardımcı 1 ve Th2 hücre profili arasındaki dengesizlik periodontal hastalıktaki kemik yıkımını arttırabilir. (Taubman ve Kawai 2001). Hücresel bağışıklıkta rol oynayan IL-2, TNF-β ve IFN-γ gibi sitokinler Th1 hücrelerinden salgılanırken, humoral immünitede görevi olan IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 sitokinleri ise Th2 hücrelerinden salınır. Yardımcı öncü T hücrelerinden IL-1β, IL-6, transforming büyüme faktörü "transforming growth factor" (TGF)-β

aracılığıyla Th17 hücreleri, IL-23 varlığında ise bu hücrelerden IL-6, TNF-α, IL-17 salgılanır. Ayrıca, Th17, IL-21, IL-22, IL-26 sentezleme yeteneğindedir (Kramer ve Gaffen 2007, Gaffen ve Hajishengallis 2008).

1.2.1. İnterlökin-1

İnterlökin-1, IL-6, TNF-α gibi proenflamatuvar sitokinler doku yaralanmasının olduğu yerlerde bulunurlar. İnterlökin-1 enflamatuvar cevabın temel belirtecidir ve mikroorganizmalar, bakteriyel toksinler, kompleman faktörleri veya doku yaralanmasına cevap olarak makrofajlar, endotel hücreleri, B hücreleri, fibroblastlar, epitel hücreleri, keratinositler, astrositler, dendritik hücreler, Langerhans hücreleri ve osteoblastlar tarafından üretilirler (Oppenheim ve ark 1987). Ayrıca, dolaşımdaki lökositlerin toplanmasını kolaylaştıran adezyon moleküllerinin ekspresyonunu, sonrasında kemik iliğinden lökosit ve trombositlerin dolaşıma geçmesini sağlarlar (Lowe 2001). Periodontopatojen olan *A. actinomycetemcomitans* ve *P. gingivalis*'nin ürettiği lipopolisakkarit makrofajların IL-1 ve TNF-α üretmelerini uyarır (Ridker ve ark 2008). İnterlökin-1 kemik demineralizasyonunu arttırır ve TNF-α ile benzer etki gösterir. *İn vitro* olarak yapılan hücre kültürü çalışmalarında IL-1'in etkisiyle fibroblastların kollajenaz ürettiği gösterilmiştir (Gemmell ve ark 1997).

İnterlökin-1 T lenfositleri uyararak aktif hale gelmelerini sağlar (Lichtman ve ark 1988), B lenfositlerin büyümesinde ve farklılaşmasında rol oynar (Pike ve Nossal 1985). Enflamasyona cevap olarak hemopoetik sistemden granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör ve granülosit stimüle edici faktörlerin salınımını sağlar (Kaushansky ve ark 1988). Enfeksiyonların akut döneminde karaciğerde üretilen akut faz proteinlerinin sentezlenmesinde de etkilidir (Steel ve Whitehead 1991). Aynı zamanda, bir endojen pirojen olup hipotalamusa etki yaparak enfeksiyon ve enflamasyon durumlarına eşlik eden ateşe neden olur (Levinson ve Jawetz 1998).

İnterlökin-1 diğer proenflamatuvar sitokinleri (IL-6, TNF-α gibi) veya PGE_2, nitrik oksit "nitric oxide" (NO) gibi enflamatuvar ürünleri üretmeleri konusunda osteoblastları uyarabilir (Hughes ve ark 2006). İnterlökin-1 karmaşık bir yapıya ve kemik yapımında paradoksal bir etkiye sahiptir. Sürekli IL-1 varlığı *in vivo* ve *in*

vitro olarak kemik yapımını engeller. Osteoblast kökenli hücrelerin farklılaşmalarınının erken aşamalarındaki hücrelerin proliferasyonunu stimüle eden IL-1, tam farklılaşma gerçekleştiğinde fonksiyonlarını baskılar (Schwartz ve ark 1997).

İnterlökin-1 agonist etkili benzer aktivite gösteren IL-1α ve IL-1β ve diğer IL-1 sitokinleriyle antagonist etki gösteren IL-1 reseptör antogonisti (ra) olmak üzere üç formdan meydana gelir. Klinik olarak enflamasyonlu ve derin periodontal ceplerin olduğu bölgelerden alınan dişeti oluğu sıvısı (DOS) örneklerindeki IL-1β miktarının sağlıklı bölgelere göre önemli derecede yüksek olduğu gösterilmiştir (Figueredo ve ark 1999). Deneysel periodontitis modelinde IL-1 antagonistinin uygulanması enflamatuvar cevabı ve alveolar kemik kaybını baskılamıştır (Assuma ve ark 1998). Periodontal hastalıkların patogenezinde; endotel hücrelerini aktive ederek bazofil, eozinofil ve nötrofillerin adezyonunu sağlayarak enflamasyon artışına (Bochner ve ark 1991), osteoklast formasyon ve aktivitesini artırarak kemik kaybına (Zee ve ark 1997, Jimi ve ark 1999, Graves ve Cochran 2003, Graves 2008) neden olurlar.

1.2.2. İnterlökin-4

Daha önceleri B hücre büyüme faktörü "B cell growth factor" olarak bilinen IL-4; B lenfositlerin yüzeyinde bulunan doku uyumluluk kompleksi "major histocompatibility complex" MHC antijenlerinin (Batten ve ark 1996) ve "Immunglobulin" (Ig)E'nin Fc reseptörlerinin ekspresyonunu arttırarak etki gösterir (Hudak ve ark 1987). Bu interlökin B lenfositlerini IgG ve IgE izotiplerini üretmeleri yönünde uyarır (Pene ve ark 1988).

İnterlökin-4, mast hücreleri, bazofiller ve T hücreleri tarafından üretilir ve antijen spesifik B hücrelerinin klonal ekspansiyonunda önemli bir faktördür. Ayrıca, IL-2 reseptörlerini azaltarak IL-2 ile indüklenen bazı aktiviteleri baskılar ve negatif immün regülasyona katkıda bulunur (Gemmell ve ark 1997)

Enflamatuvar cevapta IL-4, IL-10, IL-11 ve TGF-β yıkımın baskılanmasında rol oynayan sitokinlerdir. Hem IL-4 hem de IL-10 makrofajları hedef alarak IL-1, TNF, reaktif oksijen türleri "reactive oxygen species" (ROT) ve NO salınımını

baskılar. İnterlökin-4 aynı zamanda apoptozisi indükleyerek ortamdaki makrofajların sayısını azaltır. Hastalıklı periodontal dokularda IL-4 yetersizdir ve deneysel artritte dışarıdan IL-4 verilmesi enflamasyonu azaltmıştır (Academy Report 2002). Periodontitisli ve sağlıklı bireylerden alınan plazma örneklerindeki IL-4 miktarları periodotitisli bireylerde daha düşük bulunmuştur (Buhlin ve ark 2009).

1.2.3. İnterlökin-6

İnterlökin-6 hem "hemopoetik" hem de "nonhemopoetik" hücreler tarafından üretilir ve "preaktif murin" ve insan B hücrelerinde immünglobulin üretimini arttırır ayrıca olgunlaşmalarında da rol oynayarak yüksek düzeyde immünglobulin sentezleyen hücreler haline gelmesini sağlar. Osteoklast farklılaşmasına ve kemik yıkımına neden olurken kemik oluşumunu engeller (Gemmell ve ark 1997). İnterlökin-6 karaciğer hücrelerinden doku yaralanmaları ve enflamasyon sırasında fibrinojen gibi akut faz proteinleri olarak bilinen bazı plazma proteinlerinin sentezlenmesine yol açar (Steel ve Whitehead 1991). Enflamasyon artışının IL-6 düzeyi ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Hirose ve ark (2001) periodontitisli bölgelerden alınan doku örneklerindeki IL-6 düzeyinin sağlıklı kontrollere göre daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca, aynı araştırmada sondlamada kanama olan bölgelerden alınan örneklerde kanama olmayan bölgelere göre daha fazla IL-6 tespit edilmiştir. Dişeti enflamasyon derecesi arttıkça kollajen ve IL-4 miktarı azalırken, IL-6 ve IL-1β düzeyleri artış göstermektedir (Ejeil ve ark 2003). Interlökin-1β ve TNF-α'nın kültüre edilen gingival fibroblastlarda IL-6 ekspresyonunu uyardığı tespit edilmiştir (Palmqvist ve ark 2008).

1.2.4. Periodontal Hastalık ve Serum Sitokin Seviyeleri

Periodontal hastalıkta meydana gelen doku yıkımında artış gösteren sitokinlerin seruma geçerek sistemik olarak da etki gösterebildiği ve periodontal tedavilerin doku ve serumda sitokin düzeylerini etkileyebileceği ileri sürülmüştür (Loos ve ark 2000, Shimada ve ark 2010). Literatürde cerrahi olmayan periodontal tedavinin başlangıçta yüksek olan plazma IL-6 düzeylerini düşürdüğünü gösteren çalışmalar vardır (Marcaccini ve ark 2009, Vidal ve ark 2009, Shimada ve ark 2010). Periodontitisli hastalardan elde edilen plazma örneklerinde IL-6 konsantrasyonları

sağlıklı bireylerden elde edilen örneklere göre yüksek bulunmuştur (Loos ve ark 2000). Kronik periodontitis ve sağlıklı kontrollerden alınan kan örneklerinin incelenmesi sonucunda IL-1β'nın periodontitiste sağlıklıya göre önemli derecede yüksek olduğu IL-4'ün ise her iki grupta da tespit edilemeyecek derecede düşük olmasına rağmen kontrol grubunda daha sıklıkla tespit edildiği rapor edilmiştir (Gorska ve ark 2003).

Periodontal hastalıkta serum sitokin düzeyleri ile ilgili çelişkili sonuçlar rapor edilmiştir (Ide var ark 2003, Forner ve ark 2006, Duarte ve ark 2010). Generalize kronik periodontitis ve generalize agresif periodontitis hastalarından başlangıçta ve cerrahi olmayan periodontal tedaviden altı ay sonra elde edilen serum örneklerinde IL-4 seviyeleri generalize kronik periodontitiste artarken generalize agresif periodontitis örneklerinde azalmıştır (Duarte ve ark 2010). Kök yüzeyi düzleştirmesi yapılan hastalarda bakteriyemiyi değerlendirmek amacıyla başlangıçta ve sekiz saat sonra alınan kan örnekleri incelendiğinde IL-6'nın önemli düzeyde arttığı IL-1 seviyelerinde önemli bir değişim olmadığı kaydedilmiştir (Forner ve ark 2006). Başlangıçta ve periodontal tedaviden altı hafta sonra alınan kan örneklerinde IL-1β ve IL-6 konsantrasyonlarında herhangi bir fark bulunmamıştır (Ide var ark 2003).

1.3. Serbest Radikaller

Serbest radikaller oksijen veya nitrojen kaynaklı, atomik veya moleküler orbitallerinde bir ya da daha fazla çiftleşmemiş elektrona sahip, fiziksel olarak stabil olmayan bir çok patolojik olaya neden olan oldukça reaktif molekül veya molekül parçalarıdır (Akaike 2001). İnsanlar gibi oksijenli solunum yapan tüm canlılarda yaşam için zorunlu olan "moleküler oksijen" (O_2), elektron transport sistemlerinin son "elektron akseptörü"dür ve "Adenozin di fosfat" (ADP)'den "Adenozin tri fosfat" (ATP) elde edilen süreçte önemli rolü vardır (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 ve hidroksil radikali oluşabilir. Mitokondri ayrıca "nitrik oksit", "nitroksil anyon" ve "peroksinitrit" üretme yeteneğindedir (Cutando ve ark 2007b).

1.3.1. Reaktif Oksijen Türleri ve Reaktif Nitrojen Türleri

Reaktif oksijen türleri O_2^- kaynaklı superoksit anyon ($O_2^{\bullet-}$), hidroksil ($HO^{\bullet}$), peroksil ($RO_2^{\bullet}$) ve alkoksil ($RO^{\bullet}$) radikalleri gibi serbest radikalleri ve O_2^- kaynaklı radikal olmayan hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi türleri içeren geniş bir tanımlamadır. Hücre içindeki en önemli ROT kaynağı mitokondridir (Circu ve Aw 2010). Reaktif oksijen türleri ve reaktif nitrojen türleri "reactive nitrogen species" (RNT) normal hücresel metabolizmanın ürünleridir. Reaktif oksijen türleri ve RNT hem zarar hem de fayda yönünde ikili bir role sahiptir. Faydalı etkileri düşük/orta düzeydeki konsantrasyonlarda otaya çıkar. Çeşitli enfeksiyon ajanlarına karşı savunmada ve birçok hücresel sinyal sistemlerinin fonksiyonunda fizyolojik rolleri vardır. Serbest radikallerin neden olduğu potansiyel biyolojik hasar "oksidatif stres" ve "nitrosatif stres" olarak adlandırılır. Konak doku yıkımı biyolojik olarak ROT/RNT aşırı üretildiğinde ve enzimatik ve non-enzimatik antioksidanlarda eksiklik olduğunda meydana gelir (Valko ve ark 2007). Son zamanlarda kardiovasküler, sinir ve immün sistemlerinde her zaman bulunabilen mesaj molekülü olarak NO ve nitratif stresi arttıran bir tür olarak peroksinitrit ($ONOO^-$) gibi reaktif nitrojen türlerinin fizyolojik fonksiyonları üzerine yoğunlaşılmıştır (Nagano 2009). Reaktif nitrojen türleri, üç tane oksit; "nitrojen monoksit/nitrik oksit" (NO), "dinitrojen trioksit" (N_2O_3) ve "nitrojen dioksit" (NO_2), üç anyon; "oksidonitrat, nitroksil anyon" (NO^-), "oksidoperoksidonitrat/peroksinitrit/peroksonitrit" ($ONOO^-$), "1-karboksilato 2-nitrozodioksidan/nitrosoperoksi karbonat" ($ONOOCO_2^-$)'ı içerir (Olmos ve ark 2007).

1.3.2. Reaktif Oksijen Türleri ve Doku Hasarı

Sağlıklı dokularda ROT ve antioksidanlar arasında bir denge vardır. Eğer bu denge ROT lehine hafif bir eğilim gösterirse "oksidatif stres" düşük düzeyde olur. Bu hafif değişim "Nükleer Faktör κB" (NFκB) ve "Aktivatör Protein-1" gibi gen yazılım faktörlerini aktive eder ve bunlar proenflamatuvar sitokinlerin sentezini arttırır. Ayrıca, ROT doku yıkımını baskılayan α1-antitripsin'i azaltarak dolaylı şekilde doku hasarına neden olur (Chapple 2006). Redoks durumu antioksidanlar lehine değişirse antioksidanlar bu gen yazılım faktörlerini baskılar ve enflamasyonu azaltır (Sharma ve ark 2006).

Reaktif oksijen türleri lehine olan değişim daha fazla olursa doğrudan doku hasarı meydana gelir (Chapple 2006). Yüksek konsantrasyonlardaki ROT hücresel yapıların, nükleik asitlerin, lipid ve proteinlerin hasarlanmasında önemli olabilir. Hidroksil radikalinin DNA molekülünün bütün komponentleriyle reaksiyona girdiği bilinmektedir. Radikal atağında karbohidratlardan hidrojen atomlarının ayrılması şeker-fosfat omurgasının ayrılmasına neden olur. Çift iplikli DNA'nın bir ipliğinde atak olduğunda genellikle ölümcül değildir ve DNA tamir enzimlerince hasar giderilebilir. Radikal saldırısı aşırı olursa her iki DNA sarmalında da hasar meydana gelir. Hasarların birbirine yakın olması durumunda da DNA zincirinde kopma ve hücre ölümü gerçekleşebilir (Acworth 2001). Reaktif oksijen türleri yalnızca DNA ile değil oksidasyona oldukça duyarlı fosfolipitlerin çoklu doymamış 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).

Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz "NADPH oksidaz" ve mitokondri olmak üzere iki temel endojen ROT kaynağı vardır: Birçok hücrede bu enzim patojenlere karşı oluşturulan savunma sisteminde veya hücresel sinyal gibi önemli fizyolojik cevaplarda ROT'lerin temel kaynağıdır. Bir diğer kaynak olan mitokondride elektron transport zincir kompleksleri arasından transferle ROT oluşturulur. Farklı hücre tiplerinden "ksantin oksidaz", "siklooksijenaz", "lipoksijenaz", "myeloperoksidaz", "hem oksijenaz" gibi enzimler yoluyla da ROT üretilir (Pourova ve ark 2010).

1.3.3. Reaktif Oksijen Türleri ve Nötrofiller

Nötrofiller, eosinofiller, monosit ve makrofajlar gibi fagositik hücrelerin temel görevi mikroorganizmaları ortadan kaldırmaktır. Bunun için bu hücreler bol miktarda toksik ROT'yi üretme yeteneğine sahiptir. Normal hücresel metabolizmada bu türlerin üretimi bol miktarda yapılmasına karşın, enflamasyonda önemli oranda artış gösterir (Conner ve ark 1996). Nötrofiller tarafından ROT üretimi için minimum oksijen basıncı yaklaşık %1 ve ph 7,0 – 7,5 olmalıdır. Bu koşullar periodontal cep

içinde mevcuttur ki bu da bize kronik veya aşırı ROT üretiminin periodontal doku hasarında önemli olabileceğini göstermektedir (Chapple ve Matthews 2007). Süperoksit radikali osteoklastların yüzeyinde lokalize olarak osteoklast ilişkili kemik yıkımına katıda bulunurlar (Sharma ve ark 2006). Kronik periodontitis hastalarından alınan kan örneklerindeki nötrofiller oksijen radikaleri ile ilişkili olabilecek hiperreaktivite göstermiştir (Fredriksson ve ark 1998). İnatçı periodontitis hastalarından elde edilen nötrofiller sağlıklı gruba göre daha fazla fagositoz yapıp daha fazla oksijen radikali üretmişlerdir (Johnstone ve ark 2007).

1.3.4. Reaktif Oksijen Türleri ve Periodontal Hastalık

Periodontal hastalığın patogenezinde serbest radikallerin neden olduğu "oksidatif stres" ve "nitrosatif stres"'in önemli rol oynayabileceği düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda periodontal doku yıkımında total antioksidan kapasitesinin ve antioksidan bir enzim olan "süperoksit dismutaz" (SOD) düzeylerinin azaldığı gösterilmiştir (Brock ve ark 2004, Baltacıoğlu ve ark 2006, Akalın ve ark 2009). Periodontal patojenlerin kontrolünde önemli rol oynayan nötrofillerin *in vitro* olarak aktive edilmesi önemli derecede süperoksit anyonu üretmesini sağlamıştır (Sheikhi ve ark 2000). Oksidatif hasarın bir belirteci olan "8-hidroksi-deoksiguanozin" periodontitisli bireylerin tükürüğünde önemli derecede yüksek çıkarken, tedavi sonrasında da önemli düşüşler gözlenmiştir (Takane ve ark 2002). Periodontitisli hastaların dişeti örneklerinde oksidatif hasar belirteci olan mitokondrial DNA hasarı kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur (Çanakçı ve ark 2006). Ayrıca, periodontitisli bireylerin cerrahi olmayan periodontal tedavi sonrası DOS total antioksidan kapasitesi artarken (Chapple ve ark 2007), plazma ROT düzeylerinin azaldığı (Tamaki ve ark 2009) rapor edilmiştir. Patel (2009) ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada sağlıklı, gingivitis, periodotitis ve periodontitisli hastaların tedavi edilmesiyle oluşturulan dört grupta selenyum bağımlı antioksidan bir enzim olan glutatyon peroksidaz (GPX) DOS'ta incelenmiş ve en yüksek periodontitisli grupta bulunmuştur. Tedavi sonrasında ise neredeyse sağlıklı gruptaki değerlere yaklaşmıştır. Bu sonuçlar kronik periodontitisli bireylerin dişetinde antioksidan bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) düzeylerini sağlıklı kontrollere göre önemli derecede yüksek bulan Akalın ve ark (2005) ile paralellik göstermektedir.

1.3.5. Nitrik Oksit ve Nitrik Oksit Sentaz

Nitrik oksit 1987 yılında bulunmuş ve taşıdığı özelliklerden dolayı endotel kaynaklı rahatlatıcı faktör olarak tanımlanmıştır (Nagano 2009). Reaktif nitrojen türlerini oluşturan üç oksitten biri olan NO nörotransmisyon, kan basıncının düzenlenmesi, savunma mekanizmaları, düz kas relaksasyonu, bağışıklık sisteminin düzenlenmesi, trombosit yığılımının baskılanması gibi birçok fizyolojik olayda yer alır (Garrel ve ark 1995). Bu sıra dışı özelliklerinden dolayı 1992 yılında *Science Magazine* tarafından yılın molekülü seçilmiştir (Valko ve ark 2007).

Nitrik oksit arjininin terminal guanidino nitrogen atomundan oluşan kısa yaşam süreli (<15 saniye), gaz yapıda bir serbest radikaldir. Oksijen varlığında hızla nitrit ve nitrata metabolize olur (Clancy ve ark 1998, Isenberg ve ark 2005). 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. Peroksinitrit ve "peroksinitröz asit" (ONOOH) karbonhidratları, sülfidrilleri, lipidleri ve DNA bazlarını doğrudan okside edebilme özelliğine sahiptirler. Ayrıca, endotel hücreleri için toksik ve bakterisidaldirler. Peroksinitröz asit stabil değildir ve hızla $(NO_2)^{\cdot}$ sonrasında da $(NO_3)^{-}$ e dönüşür.

$$NO^{\cdot} + O_2^{\cdot -} \rightarrow ONOO^{-} \; (k = 6.7 \times 10^{9} \, M^{-1} s^{-1})$$

$$ONOO^{-} + H^{+} \leftrightarrow ONOOH \rightarrow (OH)^{\cdot} + (NO_2)^{\cdot} \rightarrow (NO_3)^{-} + H^{+}$$

Peroksinitrit anyonu ($ONOO^{-}$) ve peroksinitröz asit (ONOOH)'in toksisitesi O_2^{-} veya NO'in tek başına oluşturabileceğinden çok daha fazladır. Bu yüzden NO toksisitesi temel olarak süperoksit anyonu ile birlikte bulunmasına bağlıdır (Conner 1996, Clemens 1999, Akaike 2001, Valko ve ark 2007). Peroksinitrit, oksidasyon ve protein nitrasyonunu sağlayan önemli bir maddedir (Kowaltowski ve ark 2009).

Nitrik oksit, üç farklı formu olan nitrik oksit sentaz "nitric oxide synthase" (NOS) enzimi tarafından sentezlenmektedir. Nitrik oksit sentaz ikisi temel endotelyal (eNOS) ve nöronal (nNOS) ve biri uyarılabilir "inducible nitric oxide synthase"

(iNOS) olmak üzere üç farklı izoformdan oluşan ve L-Argininden NO sentezleyen bir enzimdir (Ikeda ve ark 1998). Nöronal NOS özellikle nöronlardan ve iskelet kaslarından, eNOS baskın olarak endotel hücrelerinden ve iNOS ise makrofaj/monositler tarafından üretilir (Napoli ve ark 2009). Genellikle düşük dozlarda NO salan temel izoformları sürekli aktiftir ve hücre içindeki "kalsiyum" veya "calmodulin" tarafından düzenlenir. Uyarılabilir NOS izoformunun ekspresyonu, fonksiyonu ve transkripsiyonu IL-1, TNF gibi çeşitli sitokinler, büyüme faktörleri ve hedef hücrelerdeki enflamatuvar uyaranlara cevap olarak meydana gelir ve kendi hareketleri kalsiyum miktarından bağımsız olarak temel NOS formlarından daha fazla NO salınımını gerçekleştirir (Olmos ve ark 2007).

Nitrik Oksit, Nitrik Oksit Sentaz, Enfeksiyon ve Enflamasyon

Nitrik oksitin enflamasyondaki rolü oldukça karmaşıktır. Nitrik oksit enflamasyonda yüksek düzeylerde sentezlendiği için proenflamatuvar bir ajan olarak rol oynayabilir. Diğer taraftan hücreler üzerindeki baskılayıcı etkilerinden dolayı antienflamatuvar olarak da etki gösterebilir. Farklı etkileri NO'in konsantrasyonlarına ve antioksidan/antienflamatuvar sistemlerin varlığına bağlı olabilir (Pae ve ark 2009). Aşırı sitokin üretimine cevap olarak indüklenen iNOS ekspresyonu birçok hücrede olabilecek nonspesifik bir cevaptır. Artmış iNOS ve/veya NO üretimi sepsis (Tsukahara ve ark 2001), viral enfeksiyon (Akaike 2001), organ nakillerindeki enfeksiyon (Li ve ark 2007) gibi durumlarda, yara iyileşmesi, yanık, endotoksine maruz kalma (Correia ve ark 2010), iskemi/perfüzyon yaralanmaları (Ayub ve ark 2001) ve enflamatuvar bağırsak hastalıklarında (Cross ve Wilson 2003) görülmektedir. Ayrıca, sedef, artrit, multiple skleroz, tip-1 diyabet, sistemik lupus eritematozus, sjögren sendromu gibi hastalıklarda da NO ve/veya iNOS sentezinin arttığı bilinmektedir (Clancy ve ark 1998, Clemens 1999, Isenberg ve ark 2005).

Nitrik Oksit, Nitrik Oksit Sentaz ve Sitokinler

Periodontal hastalıkta sayıları artan proenflamatuvar sitokinler ROT'lerin, ROT'lerde proenflamatuvar sitokinlerin üretimini uyarabilirler. Periodontal hastalık sırasında miktarları artan ROT'ler, monosit ve makrofajlardan proenflamatuvar

sitokin üretimini ve NFκB aktivasyonunu arttırılar (Chapple 1996). Özellikle IL-1, makrofaj, fibroblast ve osteoblast gibi hücreleri uyararak IL-6, TNF-α gibi diğer proenflamatuvar sitokinler ve PGE_2, NO gibi enflamatuvar ürünlerin daha fazla düzeyde olmasına neden olur (Hughes ve ark 2006). İnsanlardan elde edilen dişeti fibroblastlarının TNF-α, IL-1β gibi proenflamatuvar sitokinlerin varlığında NO ve iNOS sentezlediği gösterilmiştir (Daghigh ve ark 2002).

Nitrik Oksit, Nitrik Oksit Sentaz ve Periodontal Hastalık

Periodontal hastalığın patogenezinde iNOS'un önemli rol oynayabileceği belirtilmektedir. Periodontitisli bireylerde iNOS ekspresyonu sağlıklı bireylere göre daha fazla bulunmuştur (Lappin ve ark 2000, Hirose ve ark 2001, Batista ve ark 2002). Lokalize agresif periodontitisli kişilerden elde edilen nötrofillerde sağlıklı bireylerden elde edilene göre NOS aktivitesi daha yüksek bulunmuştur (Shibata ve ark 2001). Ancak, Aurer ve ark (2001) periodontitisli bireylerdeki NO sentezini sağlıklı kontrollere göre daha düşük düzeylerde saptamıştır. Nitrik oksit sentaz aktivitesi artarken ve nötrofil kemotaksisinin azaldığı, aralarında ters ilişki olduğu gösterilmiştir (Kantarcı ve ark 2003). Kronik periodontitisli, agresif periodontitisli ve sağlıklı bireylerden elde edilen dişeti örneklerindeki eNOS ve nNOS ekspresyonları incelendiğinde en yüksek agresif periodontitisli bireylerde daha az olarak kronik periodontitislilerde ve en düşük sağlıklı kontrollerde rastlanmıştır (Artese ve ark 2010). İnsan dişeti fibroblastlarının kültürüne eklenen TNF-α, IL-1β gibi proenflamatuvar sitokinlerin varlığında NO ve iNOS sentezlediği rapor edilmiştir (Daghigh ve ark 2002). Artan iNOS ekspresyonunun doku yıkımıyla bağlantılı olduğu sonucuna varılmıştır.

1.4. Apoptozis

"Apoptozis" kelimesi Eski Yunanca'dan gelmiş olup "çiçekten düşen yapraklar" anlamındadır. İlk kez 1972 yılında John Kerr tarafından tanıtılmıştır. Programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanan apoptozis mitozdan yirmi kat daha hızlıdır. "Homeostaz"ın sağlanabilmesi için hücre sayısındaki artış ve azalma arasında bir denge olmalıdır. 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).

1.4.1. Apoptozis ve Nekroz

Çok hücreli organizmalarda hücreler sürekli değiştirilir ve yerine yenisi konur. Her gün yaklaşık $1x10^{11}$ hücrenin öldüğü tahmin edilmektedir. Hücrelerin hepsi hücre yaralanması sonucunda ölmezler. Bütün hücreler önceden belirlenen bir yaşam süresine sahiptir ve belirli bir zamanın sonunda ölmeye programlanırlar. Bu durum "apoptozis" olarak tanımlanır. Yeni hücrelerin çoğalması ve yaşlı hücrelerin ölümü arasındaki denge ile vücudumuzdaki fonksiyonel hücre sayısı belirlenir. Apoptozis hücrelerin fizyolojik olarak uzaklaştırılmasında temel mekanizmadır ve embryogenezis ile normal homeostaz esnasında önemli rol oynar. Apoptototik sistemdeki bozukluklar ya aşırı hücre kaybına ya da hücrelerin yaşam sürelerinin uzamasına neden olur. Böylece apoptozisin bozulması kanser, viral enfeksiyonlar, Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklar, sistemik lupus eritematozus gibi immünojenik hastalıkların gelişmesine yol açar. Hücre ölümü "apoptotik yol" veya nekroz gibi "apoptotik olmayan yol" ile meydana gelebilir. Nekroz yoluyla hücre ölümü enfeksiyon, iskemi veya hipoksi gibi faktörlerin neden olduğu patolojik yaralanmalar sonucunda olur. Nekroz; hücresel elemanların enzimatik düzensiz sindirimi, membran bütünlüğünün bozulması, açığa çıkan parçaların hücreler arası boşluğa bırakılması ve enflamatuvar cevabın uyarılması ile karakterizedir. Apoptozisten farklı olarak nekroz, hücrelerin yeniden yerleşimi ve doku yenilenmesini engeller ve enerji gerektirmeyen bir durumdur. Apoptotik hücre ölümü hücresel komponentlerin kontrollü bir şekilde kendi kendine sindirimi ile karakterizedir. Apoptozis hücrenin büzülmesi, plazma membranının kabarması, çekirdek ve stoplazmik organellerin yoğunlaşması, DNA'nın bozulup kümelenmesi, hücre membranının kendine özgü büzülmesi ve parçalanma ile tanımlanır. Apoptotik hücreler herhangi bir enflamatuvar cevaba neden olmaksızın makrofajlar ya da komşu hücreler tarafından fagosite edilen küçük membran ilişkili cisimlere parçalanırlar. Fagositik hücreler apoptotik hücrelerden ortadan kaldırılmaları için sinyal alırlar (Crowley 2004, Wu ve ark 1996, Loro ve ark. 2005, Mattson ve ark 2001, Porth ve Kunert 2002). Apoptozisin karakteristik morfolojik özellikleri ve altında yatan biyokimyasal mekanizmalar çeşitli metotlarla tespit edilebilmesine

olanak sağlar. En sık "terminal transferaz deoksi üridin trifosfat nick-end labelling" metodu apoptotik hücrelerdeki DNA kırılmalarını tespit eder. Hematoksilen eozin ile ışık mikroskobunda, elektron mikroskobu ve apoptozisle oranı artan antikorların immünositokimyasal tekniklerle incelenmesiyle de apoptozis tespit edilebilir (Loro ve ark 2005).

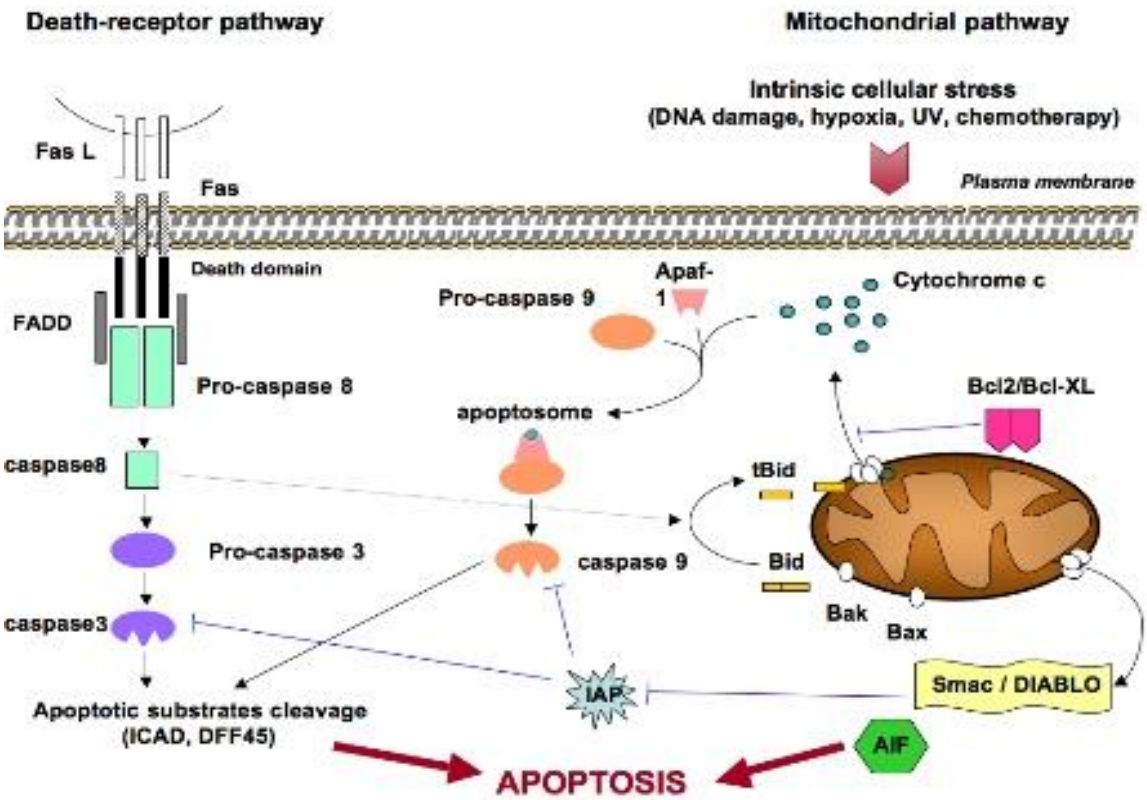
1.4.2. Apoptozis Yolakları

Apoptozis; iyonize ve ultraviyole radyasyon, viral enfeksiyonlar, bakteriyel toksinler, oksidanlar, serbest radikaller, hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerinin aktivasyonu, kimyasallar ve direkt fiziksel yaralanma gibi fizyolojik ve patolojik uyaranlarla aktive edilebilir. Bu uyaranlar farklı yollarla apoptozisi başlatır, ancak sıklıkla kaspazların dahil olduğu ortak bir yolak "pathway" kullanılır. Kaspaz aktivasyonu iki farklı yolla olmaktadır: 1) Membrandaki ölüm reseptörlerinin aktivasyonuyla başlayan dışsal "eksrinsik" yolak ve 2) Hücresel stres ve sitokrom-c gibi mitokondrial proteinlerin serbest kalmasıyla aktive olan içsel "intrinsik" yolak (Levine 2000, Thorburn 2004, Loro ve ark 2005). Ölüm reseptörü ilişkili apoptozis yolağı olan ekstrinsik yolakta ligand reseptör bağlanması ile protein-protein etkileşimleri başlar ve başlatıcı kaspazlar aktive olur. En önemli reseptörler CD95, TNF reseptör-1, TNF ile ilişkili apoptozisi arttıran ligand "TNF related apoptosis inducing ligand" reseptör-1 ve TNF ile ilişkili apoptozisi arttıran ligand reseptör-2'dir. Bu ölüm reseptörlerinin "hücre dışı ligand bağlanması", "transmembran" ve "hücre içi domeyn" olmak üzere üç fonksiyonel kısmı vardır. Ligandlar, TNF-α, CD95L ve TNF ile ilişkili apoptozisi arttıran liganddan meydana gelmektedir. Ölüm reseptörü ilişkili apoptoziste en iyi çalışan sistemlerden biri CD95/CD95L'dır (Timmer ve ark 2002, Circu ve Aw 2010).

CD95

Hücre ölümü, farklılaşması ve memeli hücrelerinin hayatının devamının sağlanmasındaki rolleriyle büyük bir reseptör ailesi olan TNF reseptörün en önemli üyelerindendir (Peter ve Krammer 1998). Ölüm reseptörü olan CD95; "APO-1" veya "Fas reseptör" olarak da bilinen 48kD'luk tip 1 membran proteinidir. Enflamasyon, proliferasyon, antiviral aktivite ve hücre ölümü gibi birçok biyolojik cevaptan

sorumlu olan TNF reseptör ailesi yaklaşık 20 üyeden oluşur. CD95 reseptörü hücre dışındaki N- terminus bölgesinde üç tane "sisteinden zengin", ligandına bağlanması için gerekli "transmembran domeyni" ve bir de ölüm domeynini içeren "stoplazma içi domeyn"e sahiptir. CD95 aktif lenfositlerden yüksek miktarda eksprese edilir, ayrıca lenfoid ve lenfoid olmayan çeşitli hücrelerden, neoplastik dokulardan ve tümör hücrelerinden de eksprese edilmektedir. Timus, karaciğer, kalp ve böbrekte de çok miktarda eksprese edilmektedir (Bruce 2001, Timmer ve ark 2002).



Şekil 1.1. CD95 İlişkili apoptozis mekanizması (Nadage ve ark 2009)

CD95L

CD95L hedef hücrelerdeki reseptörlerine bağlanarak hücresel proliferasyon ve diferansiyasyonu düzenleyen 40 kD'luk bir sitokindir. FasL olarak da bilinen TNF ailesinin bir üyesidir, 281 aminoasitten oluşur ve tip 2 membran proteini olarak sentezlenir (Linkermann ve ark 2003). CD95'in aksine CD95L ekspresyonu aktive T hücreleri, NK hücreleri gibi kısıtlı birkaç hücre tipinde görülmektedir. Dinlenme halindeki T hücrelerinde CD95L ekspresyonu olmazken aktif hale geldiklerinde yüksek düzeyde CD95L eksprese etmeye başlarlar (Weber ve Krammer 2003).

CD95 İlişkili Apoptozis Yolağı

T hücre aktivasyonu hücre yüzeyinde CD95L ekspresyonu ile sonuçlanır. CD95 eksprese eden hedef hücrelere bağlanarak aktive olmuş T hücreleri bu hedef hücreleri öldürebilir. CD95L'ın CD95 reseptörüne bağlanması, reseptörün ölüm domeynlerinin toplanmasıyla apoptozisi indükler. Fas (CD95) ile ilişkili ölüm domeyni "fas associated death domain" ; ölüm efektör domeyni "death effector domain" ve ölüm domeyni "death domain" olmak üzere iki domeyn içerir. Fas ilişkili ölüm domeyni doğrudan ya da dolaylı olarak ölüm domeyni ve pro-kaspaz-8 arasına bağlanır. CD95, CD95L, fas ilişkili ölüm domeyni ve pro-kaspaz-8'den oluşan bu kompleks ölüm oluşturan sinyal kompleksi "death-inducing signalling complex" olarak adlandırılır. Reseptörden endozomal ölüm oluşturan sinyal kompleksi serbestleşmesi ilave fas ilişkili ölüm domeyni ve pro-kaspaz-8 toplanmasını sağlar ve bu da sonuçta başlatıcı kaspaz-8 aktivasyonuna neden olur. Pro-kaspaz-8 molekülleri ölüm oluşturan sinyal kompleksi içinde yakınlaşarak dönüşürler ve atif kaspaz-8 direkt olarak kaspaz-3'ü ve diğer kaspazları aktive ederek apoptotik sürece neden olurlar. Tip I ve Tip II olmak üzere iki hücre grubu tanımlanmıştır. Tip 1 hücrelerde ölüm oluşturan sinyal kompleksindeki kaspaz-8'in aktivasyonu kolaylıkla gerçekleşir, sonrasında kaspaz-3'ün aktivasyonu ile hücre hızla ölüme gider. Bu aşama *F-actin*'nin kullanılabilirliğine bağlıdır. Yüksek düzeylerde bcl-2 eksprese eden tip 1 hücrelerde mitokondri, sitokrom-c gibi proapoptotik faktörleri serbest bırakmaz ve aktif kaspaz-8 direkt olarak kaspaz-3'ü etkiler. Tip 2 hücrelerde ölüm oluşturan sinyal kompleksi iyi bir şekilde oluşturulamaz ve hücreler CD95'le uyarılan apoptozise karşı oldukça dirençlidirler. Burada *F-actin*'nin kullanılabilirliği düşüktür ve çok az miktarda kaspaz-8 üretilir. Sonuçta mitokondri ile ilişkili içsel yolak devreye girer (Timmer ve ark 2002, Thorburn 2004, Gastman 2001, Lawen 2003, Barnhart ve ark 2003). İçsel yolak; oksidatif stres, sitotoksik ilaçlar gibi hücre içi ve dışı uyaranlar tarafından aktive edilmiş "mitokondrial" yolağı içerir. Apoptotik sinyal mitokondri membranından stoplazma içine "sitokrom-c*"* salınmasına neden olur ve apoptotik proteaz aktive edici faktör "apoptotic protease activating factor-1" ile "apoptozom"u oluşturur. Apoptozomun başlatıcı kaspazı olan pro-kaspaz-9'un aktive edilmesi efektör kaspaz olan kaspaz-3'ü aktive ederek apoptotik zinciri başlatır (Lawen 2003).

1.4.3. Apoptozis ve Reaktif Oksijen Türleri

Reaktif oksijen türleri programlanmış hücre ölümü olan apoptoziste etkilidirler. Oksidatif stresle aktive olduğunda mitojenle aktive edilmiş "c-Jun N-terminal kinaz"'lar (JNKs) ve p38 proapoptotik, hücre dışı sinyal düzenleyici kinazlar "extracellular signal-regulated kinases" (ERK) gibi proteinkinazlar antiapoptotik faktör olarak rol oynar. Apoptozis için önemli aşamalardan birisi de JNKs aktivasyonudur. Apoptozisi düzenleyen önemli proteinlerden biri olan bcl-2 ailesi yoluyla ve mitokondriden apoptotik faktör sitokrom-c salınımının uyarılmasıyla ROT'ler hücre ölümüne katkıda bulunabilirler (Pourova ve ark 2010). Reaktif oksijen türlerinin ölüm reseptörü aktivasyonu ile ilişkili apoptozisteki direkt rolü kesin değildir. Ancak, ROT ve mitokondrial DNA hasarı vasıtasıyla içsel yolak, JNK aktivasyonu ile hem içsel hem de dışsal yolağı uyarabilirler (Circu ve Aw 2010). Endojen olarak solunumsal patlama sırasında üretilen ROT'ler fagositlerde apoptozisten önce olan CD95 ilişkili sinyal iletimine dahil olurlar. Polimorfo nükleer lökosit (PMNL) kültürlerine hidrojen peroksit eklenmesi uyarandan bağımsız olarak apoptozisi arttırmıştır. Hipoksik koşullarda kültüre edilen PMNL'lerde ROT üretimi baskılandığı için apoptozis baskılanmıştır (Splettstoesser ve Schuff-Werner 2002).

1.4.4. Apoptozis ve Nitrik Oksit, Nitrik Oksit Sentaz

Mitokondride üretilen ROT ve RNT'ler apoptozisi uyarabilir ya da baskılayabilir. Nitrik oksitin pro ve antiapoptotik özellikleri düzeyleriyle ilişkili olabilir. Nitrik oksit düşük düzeylerde hepatositlerde, B lenfositlerde ve eazinofillerde kaspaz-3 benzeri aktiviteyi baskılayarak apoptozisi önlerken, yüksek oranlarda makrofajlarda, kondrositlerde, CD+4/CD+8 timositlerde vb. hücrelerde apoptozisi uyarabilir. Nitrik oksit ve süperoksitin birlikte bulunması peroksinitrit formasyonu yoluyla apoptozisi arttırabilir (Circu ve Aw 2010). Pankreatik adenokarsinoması olan hastalardan elde edilen örnekler immünhistokimyasal olarak incelendiğinde iNOS eksprese eden hücre sayısının fazla olduğu ve iNOS eksprese eden hücrelerdeki apoptotik indekslerin iNOS eksprese etmeyen hücrelerden daha fazla olduğu saptanmıştır. Bu sonuç iNOS ekspresyonunun tümör hücrelerinin apoptozisinde rol oynayabileceğini gösterebilir (Kong ve ark 2002).

Sistemik enflamasyonda beyinde iNOS'un baskılanması mitokondriden AIF'nin salınımını baskılamış, hem yapısal hem de indüklenebilir NOS enzimleri tarafından üretilen $NO^{\cdot}$ apoptozis yolaklarını aktive etmiştir (Czapski ve ark 2007). İnsan koroner arterlerinden elde edilen aterom plaklarının bol miktarda iNOS eksprese ettiği sonuçta açığa çıkan NO'in Fas/FasL ilişkili apoptozisi arttırdığı bildirilmiştir (Esaki ve ark 2000). Sıçanlarda oluşturulan deneysel otoimmün uveit modelinde NO'in CD95 ilişkili apoptosis yolağı ile T hücrelerinin apoptozisine neden olmuştur (Liversidge ve ark 2002). Bununla birlikte insan T lenfositlerinden elde edilen hücre kültüründe iNOS'un baskılanması kaspaz-3 aktivitesini azaltarak apoptozisin daha az olmasını sağlarken CD95 ekspresyonunu etkilememiştir (Kiang ve ark 2008).

1.4.5. Apoptozis ve Periodontal Hastalık

Periodontal hastalıkta apoptozisle ilişkili çalışmalarda çelişkili sonuçlar bulunmuştur. Kronik periodontitisli hastalarda nötrofil apoptozisinin geciktiği gösterilmiştir (Gamonal ve ark 2003). 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). Sağlıklı ve periodontal hastalıklı bireylerden elde edilen gingival biyopsilerin incelenmesi sonucunda sağlıklı dokularda CD95 ekspresyonuna rastlanmazken, periodontal hastalıklı dokularda CD95 pozitif hücre düzeyinde artış tespit edilmiştir (Gamonal ve ark 2001). Agresif periodontitisli bireylerde apoptozisin geciktiği ve enflamatuvar hücrelerin sayısının artmasıyla hızlı bir periodontal yıkımın gerçekleştiği gösterilmiştir (Bulut ve ark. 2006). Klasik apoptotik yolaklardan farklı olarak *P. gingivalis,* protein kinaz A ve apoptozis indükleyici faktör "apoptosis inducing factor" yoluyla (AIF) fibroblast apoptozisini arttırmıştır (Desta ve ark 2007). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* kaspaz-1'in dahil olduğu yolakta ürettiği lökotoksinle lökositlerin apoptozisini arttırır. (Loro ve ark 2005). Bakteriyel lipopolisakkaritler doza bağlı olarak *in vitro* koşullarda nötrofillerin yaşam sürelerini uzatıp doku hasarına yol açar (Preshaw ve ark 1999). Şüpheli periodontopatojenlerden olan *P. gingivalis*'in CD95-CD95L ekspresyonunu arttırarak epitel hücrelerinde apoptozisi uyardığı bulunmuştur (Brozovic ve ark

2006). Periodontal hastalıklı bireylerden elde edilen örneklerin incelendiği bir başka çalışmada lenfositlerin bol miktarda CD95 eksprese ettiği, ancak yeterince ölüm sinyali oluşturulamadığı için bu hücrelerin dirençli hale geldiği ve sonuç olarak hastalığın kronikleşmesinde rol oynadığı belirtilmiştir (Sawa ve ark 1998). *Porphyromonas gingivalis* tarafından üretilen lipopolisakkaritler ve *T. forsythia* tarafından üretilen lipoproteinlerin fibroblastlar ve keratinositlerde apoptotik sinyali arttırdığı gösterilmiştir (Loro ve ark. 2005). *İn vitro* olarak çeşitli periodontopatik bakteriler CD95 ölüm reseptörünün dahil olduğu konak ilişkili sitotoksik aktiviteyi tetikleyebilir (Bantel ve ark. 2005).

Nötrofil apoptozisi erken enflamatuvar cevabın süresinin kontrolünde önemlidir ve böylece nötrofillerin uzun süre aktive kalmalarını engelleyerek lokal doku hasarının sınırlı kalması sağlanır. Granülosit monosit uyarıcı faktör "granulocyte monosit stimulating factor", TNF-α, gibi çeşitli proenflamatuvar sitokinlerin bcl-2 proteinlerinin düzeyini değiştirerek nötrofil apoptozisinin gecikmesinde rol oynadığı bilinmektedir (Sharma ve ark 2006). Crawford ve ark (2000)'nın yaptığı bir çalışmada ise dişeti oluğu sıvısı, periodontal cep ve ağız boşluğundan elde edilen nötrofillerin yaşamlarının apoptozisle değil nekrozla son bulduğu gösterilmiştir. *İn vitro* şartlarda gram negatif anaerobik subgingival mikrobiyal floradaki bakterilerin metabolizması sonucu ortaya çıkan kısa zincirli karboksilik asitler düşük konsantrasyonlarda PMNL apoptozisini geciktirirken, yüksek konsantrasyonlarda kaspaz-3'ün dahil olduğu yolda apoptozisi hızlandırmıştır (Sorkin ve ark 1998, Stehle ve ark 2001). *İn vitro* bir çalışmada, enflamasyonlu periodontal dokularda yüksek miktarlarda bulunan "poliamin"lere uzun süre maruz kalan PMNL'lerde apoptozis baskılanmıştır (Ratasirayakorn ve ark 1999).

1.5. Antioksidanlar

"Prooksidan" ve "antioksidan" dengesinin "prooksidan"lar lehine bozulmasıyla oksidatif stres meydana gelir. Organizmada her gün her bir hücre yaklaşık bir–üç milyon kez radikal saldırısına uğrar bu yüzden antioksidan defans sistemleri organizmaların sağlığının korunmasında çok önemlidir (Chaple ve Matthews 2007). Antioksidan savunma sistemleri; "dolaylı enzimatik antioksidan enzimler", "serbest radikalleri doğrudan toplayan küçük moleküller" ve "ilişkili

reaktanlar" şeklinde sınıflanabilir. Toksik ürünlere karşı ilk savunma sistemini oluşturan antioksidan enzimlerden biri oksijenin indirgemesinde rol alan süperoksit dismutazdır. Diğer enzimler hidrojen peroksiti ortamdan uzaklaştıran peroksidazlar ve katalazdır. En çok bulunan peroksidaz, selenyum bağımlı glutatyon peroksidazdır (Cutando ve ark 2007b). Dış kaynaklardan alınan E vitamini, C vitamini gibi antioksidanlar hücre membranında, hücre içinde ve hücreler arasında yerleşebilirler. Bunlar ROT'leri baskılar ya da ortamdan uzaklaştırır. (Rodrigo ve ark 2007).

Antioksidan savunma sistemleri yapısal özellikleri, kaynakları, fonksiyonları, çözünebilirlikleri ve bulundukları yerlere göre Tablo 1.1.'deki gibi sınıflandırılabilirler (Chapple ve Matthews 2007).

1.5.1. Selenyum

Selenyum periyodik cetvelin VI A alt grubunda yer alan, atom numarası 34, molekül ağırlığı 78.96 gr, ametalik, gri renkli, katı, yoğunluğu 4.81 g/cm^3 olan 220^{o}C'lik erime ve 685^{o}C'lik kaynama noktasına sahip bir elementtir (Jones ve Atkins 1999).

Doğada genellikle bakır, çinko, kurşun gibi metallerin sülfidleri ile birlikte bulunur. Gümüş renkli metalik formda ya da daha az stabil olan kırmızı amorf toz şeklinde elde edilir. Havada yanar, sudan etkilenmez, yoğun HNO_3 ve alkalilerde çözünür. Fotoelektrik pillerde, fotokopi makinelerinde ve yarı iletkenlerde kullanılır. Berzelius isimli bir araştırmacı tarafından 1817 yılında İsveç'te bulunmuş ve eski yunan ay tanrıçası *Selen*'e göre adlandırılmıştır (Emsley 1998). Glutatyon peroksidaz enziminin yapısındaki seleno-protein varlığının tespit edilmesiyle 1973 yılında insanlar için alınması zorunlu bir element olduğu anlaşılmıştır (Thomassen ve ark 1994). İnsan sağlığı için gerekli antioksidan, antienflamatuvar ve antiviral özellikleri olan bir elementtir (Navarro-Alarcon ve Cabrera-Vique 2008). Dokularda selenyum "selenometionin" ve "selenosistein" olmak üzere iki farklı formda bulunur: Dokularda sentezlenemeyen selenometionin sadece bitkisel besinler yoluyla alınır, metabolik olarak aktif değildir ve vücutta selenyum yetersizliği meydana geldiğinde kullanılmak üzere depolanır.

Tablo 1.1. Antioksidanların Sınıflandırılması (Chapple ve Matthews 2007)

Antioksidanlar	Örnekler
Fonksiyonlarına göre:	
Engelleyici antioksidanlar	Enzimler: Süperoksit dismutaz (1,2 ve3), katalaz, glutatyon peroksidaz, DNA tamir enzimleri ve diğerleri
	Metal iyon taşıyıcıları: Albumin, laktoferrin, transferin, haptoglobin, seruloplazmin, hemopeksin, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz ürik asit ve diğerleri
Temizleyici antioksidanlar	Askorbat (C vitamini, karotenoidler(A vitamini), ürik asit, alfa-tokoferol (E vitamini), bilirubin, albumin, indirgenmiş glutatyon ve diğerleri
Yerleşim yerlerine göre:	
Hücre içinde	Süperoksit dismutaz (1 ve 2), katalaz, glutatyon peroksidaz, DNA tamir enzimleri, indirgenmiş glutatyon, indirgenmiş ubiquinone
Hücreler arasında	Süperoksit dismutaz (3), selenyum- glutatyon peroksidaz, indirgenmiş glutatyon, Albumin, laktoferrin, transferin, haptoglobin, seruloplazmin, askorbat, karotenidler, ürik asit
Membran ilişkili	Alfa-tokoferol
Orijinlerine göre:	
Eksojen antioksidanlar	Karotenidler, askorbik asit, tokoferoller, polifenoller, folik asit, sistein
Endojen antioksidanlar	Katalaz, superoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, indirgenmiş glutatyon, seruloplazmin, transferin, ferritin, peroksizomlar, proteazlar
Sentetik antioksidanlar	N-asetilsistein, penisilinamin, tetrasiklinler
Davranış şekillerine göre:	
DNA koruyucular	Süperoksit dismutaz (1 ve 2), glutatyon peroksidaz, DNA tamir enzimleri, indirgenmiş glutatyon, sistein
Protein koruyucular	Engelleyici antioksidanlarla geçiş elementlerinin bloke edilmesi, Yarışan substratlar tarafından toplanma, Antioksidan enzimler
Lipid koruyucular	İndirgenmiş glutatyon, askorbat, ürik asit alfa-tokoferol, karotenoidler, bilirubin, glutatyon peroksidaz
Çözünürlüklerine göre:	
Suda çözünenler	İndirgenmiş glutatyon, albumin, transferin, haptoglobin, seruloplazmin, askorbat, ürik asit
Yağda çözünenler	Alfa-tokoferol, karotenoidler, bilirubin, quinonlar

Selenoproteinlerde (SelP) bulunan selenosistein selenyumun biyolojik yönden başlıca formudur ve hayvansal kaynaklı besinlerden sağlanır. Selenyumun sodyum selenit (Na_2SeO_3) ve sodyum selenat (Na_2SeO_4) olmak üzere iki inorganik formu vardır. Sodyum selenitin tümör önleyici özelliği organik formlara göre daha yüksektir (Üstdal ve ark 2003).

Selenyum hayvanlara selenat ve selenit gibi inorganik formlar ile selenomethionin ve selenosistein gibi organik formlar şeklinde verilebilmektedir. Mahan ve ark (1999) büyüme devresindeki domuzlara verilen organik selenyumlu mayanın kaslardaki selenyum depolanması üzerine sodyum selenitten, sodyum selenitin ise GPX üzerine organik selenyumdan daha etkili olduğunu gözlemişlerdir. "Broyler" cinsi kanatlılarda sodyum selenit ve organik selenyum ilavesinin kan glikoz, kolesterol, üre, ürik asit vb. değerlerinin karşılaştırıldığı çalışmada gruplar arasında fark bulunmamıştır (Çetin ve ark 2002). Sodyum selenit ve selenometionin verilen domuzlarda her iki grupta dokulardaki selenyum içeriği ve GPX aktivitesi artmış, malondialdehit seviyesi azalmıştır (Zahn ve ark 2007).

Yiyeceklerdeki protein içeriği selenyum varlığı için önemli bir faktördür. (Navarro-Alarcon ve Cabrera-Vique 2008). Et, tavuk, balık ve yumurtada içeriklerindeki yüksek proteinden dolayı yüksek miktarda selenyum bulunur. Meyvelerde ve sebzelerde düşük protein ve yüksek su içeriğinden dolayı selenyum düşük konsantrasyonlarda yer alır (Levander 1986). Selenyum yaşam için gerekli bir elementtir ve hayvanlar ve insanlar için yeterli miktarda alınması zorunludur. Selenyumun yetişkinler için önerilen günlük dozu 55μg/gün (0,8-1,1 μmol/gün), çocuklar içinse 15-20μg/gün'dür (Boosalis 2008).

Selenyum önemli biyolojik fonksiyonları bulunan yaklaşık on altı SelP'nin yapısına girerek apoptozis, GPX'in yeniden sentezi, detoksifikasyon, antioksidan mekanizmalar gibi fonsiyonlarda etkili olur. Oksidatif strese karşı koruyucu olan GPX enzim ailesinin kofaktörüdür. GPX1 stoplazmadaki güçlü antioksidandır. GPX2 gastrointestinal sistemde, GPX3 hücreler arası boşluklarda ve plazmada, hücre membranında GPX4, epididimiste GPX5, burun epiteli ve embriyonik dokularda GPX6 bulunur (Pappas ve ark 2008). Bu enzimler hidrojen peroksit gibi peroksitleri indirgeyerek lipid peroksidasyonunu azaltan glutatyonu, tekrar kullanılır hale

getirirler. GPX ve SelP enflamatuvar cevapta etkilidir. Ayrıca, SelP reaktif nitrojen türlerinin kaynağı olan proksinitrit ($ONOO^-$) miktarını azaltarak damar endoteli ile ilişkili hücre dışı antioksidan olarak rol oynar (Navarro-Alarcon ve Cabrera-Vique 2008).

Üç izoformu bulunan "iodothyronine deidodinases" troid hormon molekülünden iyodu ayırır. Tip-1 iodothyronine deidodinase bir SelP'dir ve tiroksin (T_4) hormonunun tiroidin aktif hormonu olan 3,3',5-triiodothyronine (T_3)'e dönüşmesi reaksiyonunundan sorumludur. Selenyum eksikliğinde tip-1 enzimin aktivitesi düşer (Aksoy 2000, Chaney 2006). "Thioredoxin reductase" Se bağımlıdır ve hücre içindeki substratları azaltarak kanser önleyici (Navarro-Alarcon ve Cabrera-Vique 2008), diğer antioksidan enzimleri arttırıcı, çeşitli transkripsiyon faktörlerini azaltıcı, apoptozisi düzenleyeci ve protein fosforilasyonunu azaltıcı özellikleriyle birlikte antioksidan etkinliğini gösterir (Pappas ve ark 2008).

İnsan vücudundaki toplam selenyum miktarı 10-20 mg arasında değişmektedir ve büyük bölümü kas dokusundadır. Bağışıklık sistem hücreleri, eritrositler, trombositler de yüksek oranda selenyum kullanırlar (Levander 1986). Bağırsaktaki emilim miktarı %50-80 oranında oldukça yüksektir. Selenyum çok düşük yoğunluklu lipoprotein "very low density lipoprotein" ve düşük yoğunluklu lipoprotein "low density lipoprotein" ile bağırsaklardan taşınır. Büyük oranda (%60) idrarla atılır ancak bu miktar selenyumun yapısına göre değişir, %35'i feçesle geri kalan da solunumla atılır (Aksoy 2000).

Selenyum insan sağlığıyla yakından ilişkili olan bir mineraldir. Orta dereceli selenyum eksikliğinde artmış enfeksiyon ve kanser riski, erkeklerde kısırlık, immün cevap ve tiroid fonksiyonlarında azalma, Alzheimer, Parkinson gibi nörolojik hastalıklar ortaya çıkabilir (Navarro-Alarcon ve Cabrera-Vique 2008).

"Akut", "subakut", "kronik" ve gizli "latent" olmak üzere dört forma sahip temel histopatolojik özelliği "multifokal myokardiyal nekroz"lar olan "Keshan hastalığı" özellikle Çin'in bazı bölgelerinde selenyum eksikliğine bağlı olarak meydana gelmektedir (WHO 1996). Çin, Kuzey Kore ve Sibirya gibi selenyumun az bulunduğu bölgelerde görülen bir diğer hastalık "Kashin-Beck Hastalığı"dır. Bu

hastalık kemik metabolizmasında bozukluk, kısa el ve ayak parmakları ve yaygın olarak görülen cücelikle ilişkili endemik osteoartropatidir. Keshan ve Kashin-Beck hastalığı selenit ile başarılı şekilde tedavi edilmektedir (Trace'89 1989).

Selenyum için yetişkin bireylerde tolere edilebilecek üst sınır 400 μg/gün'dür (WHO 1996). Bunun üstündeki dozlar insanlarda saç dökülmesi, tırnaklarda değişiklikler, gastrointestinal rahatsızlık, bulantı, kusma, nefesin sarımsak gibi kokması, yorgunluk, asabiyet, periferal nöropati, deri döküntüsü ve sinir sisteminin anormal fonksiyonuyla karakterize olan selenozisle sonuçlanır (Levander 1986).

Selenyumun Kollajen Kaybına Etkisi

Diyabetik ratlara dört hafta süresince verilen sodyum selenit kalp dokularında miyofibril kaybını ve miyosit çapındaki azalmayı engellemiştir (Ayaz ve ark 2002) Sıçanlarda karbon tetra klorürle oluşturulan karaciğer hasarında selenyum hepatik fibrozis ve enflamasyonu azaltmış ancak apoptozisi arttırmıştır. Fibrozisin azalmasındaki temel mekanizma kollajen üreten hücrelerin sayısının azalması ve artmış kollajen yıkımıdır (Ding ve ark 2010). Kashin-Back hastalığı ile ilişkili moniliformin kıkırdak dokuda tip II kollajen sentezini azaltan ve kollajeni yıkan temel enzim olan MMP'lerin sentezini arttıran bir maddedir. Kondrosit hücre kültürüne selenyum ilavesi kollajenin yıkımının daha az olmasını sağlamıştır (Zhang ve ark 2009).

Selenyumun Sitokin Düzeylerine Etkisi

Bronşiyal epitel hücrelerinden elde edilen kültüre selenyum eklenen ve eklenmeyen olmak üzere iki grup oluşturulmuş ve selenyum ilave edilmeyen gruptaki IL-6 düzeyi daha yüksek bulunmuştur (Jaspers ve ark 2007). *İn vitro* bir çalışmada fizyolojik düzeydeki sodyum selenit enflamatuvar sitokinleri kodlayan genleri düzenleyen NFκB'nin aktivasyonunu baskılamıştır (Maehira ve ark 2002). Zeng ve ark (2009)'nın farelerde yaptığı çalışmada streptozotosinle diyabet modeli oluşturarak uygulanan sodyum selenit pankrestaki iNOS ve IL-1β, TNF-α, IFN-γ gibi pro-enflamatuvar sitokinlerin mRNA ekspresyonlarını azalmıştır. Ancak, literatürde sodyum selenit uygulamasının serum sitokin düzeylerine etkisini araştıran az sayıda

çalışma vardır (Grundling ve ark 2009). Gründling ve ark (2009) sıçanlarda LPS'le sistemik olarak deneysel endotoksemi oluşturduktan sonra 100 μg/kg tek doz ve sadece bir gün sodyum selenit uygulamışlar ve plazma TNF-α, IL-1β, IL-6 ve IL-10 düzeylerinin değiştirmediğini saptamışlardır.

Selenyumun iNOS Ekspresyonuna Etkisi

Literatürde sodyum selenitin iNOS ekspresyonu üzerine etkisini araştıran çalışmalar sınırlıdır. Zeng ve ark (2009) farelerde streptozotosinle diyabet modeli oluşturarak kontrol, diyabetli sodyum selenit alan ve diyabetli olup sodyum selenit almayan olmak üzere üç grubu değerlendirmişleridir. Pankrestaki iNOS ve IL-1β, TNF-α, IFN-γ gibi proenflamatuvar sitokinlerin mRNA ekspresyonları incelendiğinde, en düşük değerler kontrol, daha sonra selenitle tedavi edilen diyabetli ve en yüksek de tedavi yapılmayan diyabetli grupta saptanmıştır. Lipopolisakkaritle stimüle edilmiş RAW 264.7 hücrelerinde iNOS ekspresyonu ile hücresel selenyum düzeyleri arasında ters ilişki bulunmuştur. Selenyum uygulaması oksidatif stresle ilişkili enflamatuvar hastalıklarda tedavi edici veya engelleyici olarak kullanılabileceği düşünülmektedir (Prabhu ve ark 2002, Yun ve ark 2007). İnsan akciğer adenokarsinoması ve T hücrelerinden elde edilen kültüre sodyum selenit eklenmesi enflamatuvar sitokinler ROT'ler, bakteriyel ürünler gibi maddelerle sentezi uyarılan, enflamatuvar sitokinler, adezyon molekülleri gibi birçok maddenin gen yazılımından sorumlu NFκB sentezini baskılamıştır (Kim ve ark 1997). Makrofaj hücre kültüründe gram negatif bakteri kaynaklı endotoksinlerin iNOS ekspresyon düzeyini arttırdığı ve sodyum selenit uygulamaların bu yıkıcı etkiyi baskıladığı rapor edilmiştir (Sakaguchi ve ark 2000).

Selenyumun Apoptotik Hücre Ölümüne Etkisi

Kanser hastalığında genellikle azalan apoptozis oranları selenyum uygulaması ile artma eğiliminde olup selenyumun hastalıkla ilgili olumlu etkilerinin sebebi olabilir. Mitojen aktive edici kinaz "mitogen activated protein kinase" (MAPK) ailesinin bir üyesi olan JNK1 hücre çoğalması, farklılaşması ve apoptoziste önemli rol oynar. Sodyum selenit uygulamasının *invitro* ve *invivo* olarak JNK1 aktivasyonu ve β-catenin sinyalinin baskılanmasıyla bağırsak kanserlerini engellediği

gösterilmiştir (Fang ve ark 2010). Sodyum selenit kanser riskine karşı dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. Boyun kanserleriyle ilgili bir başka *in vitro* çalışmada sodyum selenit kaspazdan bağımsız, daha çok oksidatif stres ilişkili p53 ve p38 yolaklarının aktivasyonu ile apoptozisi arttırabileceği gösterilmiştir (Rudolf ve ark 2008). Sodyum selenit ile arttırılan hepatoselüler kanser hücrelerindeki apoptozis doz ve zamana bağlı olarak hücre içinde üretilen ROT ile ilişkilidir (Cherukuri ve Nelson 2008). Aynı hücrelerdeki sodyum selenitle artış gösteren ROT ilişkili apoptoziste JNK'nin etkili olabileceği ortaya konmuştur (Zou ve ark 2008). Apototik mekanizmanın hızlandığı patolojilerde ise selenyum apoptozisi baskılama eğilimindedir. Kadmiyumla oluşturulan karaciğer sitotoksisinde sodyum selenit *in vitro* olarak kadmiyumla artan ROT üretimini, sitokrom-c salınımını ve kaspaz üretimini engelleyerek ayrıca "bcl-2" ve "bax" düzeylerini değiştirerek antiapoptotik etki gösterir (Zhou ve ark 2009). *İn vitro* olarak yapılan bir başka çalışmada sodyum selenit uygulaması apoptozisi artıran hidrojen peroksit varlığında anti-apoptotik yolak olan P13-K/Akt'ın aktivasyonunu, apoptotik yolak olan ASK1/JNK'nın baskılanmasını sağlayarak apoptozisi azalttığı rapor edilmiştir (Yoon ve ark 2001).

1.5.2. Alfa-Tokoferol

Evans ve Bishop tarafından E vitamini terimi ilk kez 1922 yılında hayvanlar için önemli bir diyet faktörü olarak tanıtılmıştır. İki alt kümesinin olabileceği 1936 yılında gösterilmiş ve bunlar α ve β tokoferol olarak tanımlanmıştır. Takip eden yıllarda bunlara γ ve δ tokoferol ve tokokotrienoller eklenerek sekiz alt gruptan oluştuğu ortaya konmuştur (Azzi ve Stocker 2000). Buğdaydan 1936 yılında izole edilen vitamine Yunanca'da yavru yapma anlamına gelen tokoferol adı verilmiştir. Laboratuvarlarda kimyasal yollarla elde edilmesine 1938 yılında başlanmıştır (Kaya 1993).

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. Tocotrienoller chromanol halkasında tokoferollerle aynı paterne sahipken 16 karbonluk doymamış zincirin 3', 7' ve 11' pozisyonlarında üç tane çift bağ bulunmaktadır. Bu moleküllerin hepsi antioksidan özelliğine sahiptir; ancak alfa-

tokoferol kimyasal ve biyolojik olarak en etkili olandır. Genellikle E vitamini alfa-tokoferolle eş anlamlı olarak kullanılır fakat E vitamininin sekiz doğal formundan sadece biridir (Schneider 2005, Rodrigo ve ark 2007). Besinler içindeki E vitamini etkinliğinin yaklaşık %80'inin alfa-tokoferol'e bağlı olduğu, geri kalan %20'sinin diğer tokoferol türevlerinden ve tokotrienollerden ileri geldiği kabul edilmektedir. Alfa-tokoferolün kimyasal olarak ölçümüne ait yerleşmiş yöntemler bulunduğu ve diğerlerinin kimyasal olarak ölçümü zor olduğu için besinlerin E vitamini etkinliği değerlendirilirken sadece alfa-tokoferol miktarı ölçülür. Ayrıca besin içindeki diğer türevlerin varlığından ileri gelen ve alfa-tokoferolünkinin %25'ine eşit değerde ilave bir E vitamini etkinliğinin daha bulunduğu kabul edilerek bu değer ölçüme eklenir (kayaalp 2005).

E vitamini içeren ticari formlar doğal olarak; RRR-α-tocopherol (RRR-αT), sentetik olarak; alfa-tokoferol (rac-αT) ve her ikisinin karışımı şeklinde bulunur (Kirmizis ve Chatzidimitriou 2009). Doğal olan (RRR-αT) tek "stereoisomer"dir. Sentetik olan ise (rac-α-T) sekiz stereoisomerin karışımıdır ve *d*–alpha-tocopherol bunlardan biridir. Diğer yedi isomerin biyolojik etkinliği buna göre düşüktür. Doğal formlar sentetik olanlara göre biyolojik olarak daha etkindir (Banks 2001).

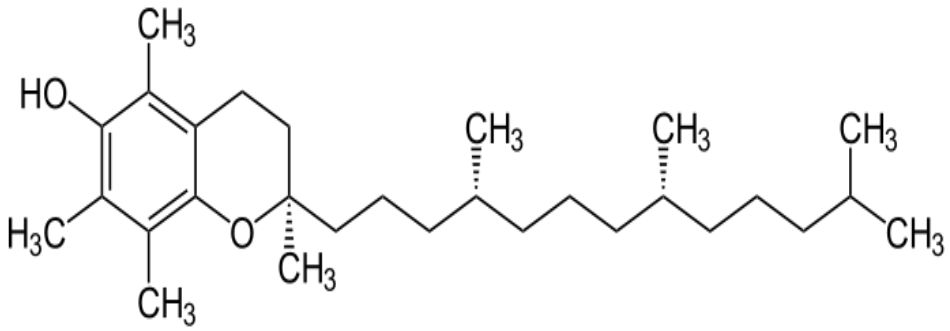
Kromanol halkasındaki metil gruplarının özellikle aktif C-6 hidroksi grubundaki hidrojen ile yer değiştirme paterni peroksil radikaline hidrojen transferini kolaylaştırdığı için kimyasal olarak, karaciğerdeki transport mekanizmasında tercih edildiği için biyolojik olarak alfa-tokoferol E vitaminin en aktif formudur. Aynı koşullar altında alfa-tokoferol diğer yağda çözünen antioksidanlardan daha fazla hidrojen atomunu yağ asiti peroksil radikaline transfer eder. Alfa-tokoferol suda çözünmez, yağ, aseton, etanol, eter ve diğer organik çözücülerde çözünür (Schneider 2005).

Yağda çözünen bir vitamin olan E vitamini hücre membranının lipid yapısından dolayı onun bütünlüğünü korumakla görevli en önemli antioksidandır (Rodrigo ve ark 2007). Mitokondri, endoplazmik retikulum ve plazma zarlarının fosfolipidleri alfa-tokoferole afinite gösterir. Tokoferoller, fenolik bir hidrojeni bir peroksitlenmiş çoğul doymamış yağ asitinin peroksil serbest radikaline aktarma

becerilerinin sonucu olarak serbest radikal zincir tepkimesini kıran bir antioksidan olarak etki yapar (Murray 1999).

Yapısında Se bulunan GPX hidroperoksitlere karşı ikinci savunma hattını oluşturur. Yani tokoferol ve Se lipid peroksitlere karşı birbirlerinin etkilerini güçlendirir. Buna ek olarak Se, E vitamini dahil yağların sindirim ve emilimi için gereken normal pankreas işlemi için gereklidir. E vitamini vücutta Se kaybını önleyerek veya bunu etkin formda tutarak Se'a duyulan gereksinimi azaltır (Murray 1999).

E vitaminin farklı formlarının biyoyararlanımlarının farklı olması alfa-tokoferol'ün önemini ortaya koyar. Alfa-tokoferol oksidasyona karşı LDL'yi koruyarak plak rüptürünü, trombosit adezyonu ve vasospazmı azaltarak koroner arter hastalığı riskini düşürür, düz kas hücre proliferasyonunu baskılar ve endotelyal hücre devamlılığını sağlar, çözünebilir adhezyon moleküllerinin seviyesini azaltır, monositlerden salınan reaktif oksijen türlerinin ve IL-1β, IL-6, TNF-α gibi gibi proenflamatuvar sitokinlerin salınımını azaltır. Siklooksijenaz-2 ve 5-lipoksijenaz yoluyla oluşan enflamatuvar belirteçlerin baskılanmasını sağlar (Azzi ve Stocker 2000, Singh ve ark 2004, Reiter ve ark 2007, Kirmizis ve Chatzidimitriou 2009).



Şekil 1.2. Alfa-tokoferol'ün moleküler yapısı (MacWilliam 2006)

Hidroksil radikalleri, hidrojen peroksitler ve singlet oksijen apoptotik hücre ölümünü arttırır. Alfa-tokoferol gibi antioksidanlar bu moleküllerin proapoptotik özelliklerini önlerler (Splettstoesser ve Schuff-Werner 2002). İnsan meme kanseri hücrelerinde tokoferollerin apoptozisi arttırdığı gösterilmiştir (Azzi ve Stocker 2000).

Serbest radikal hasarı ile ilişkili kardiyovasüler hastalık, kanser, erken yaşlanma, katarakt gibi koşullarda alfa-tokoferolün koruyucu etkisi vardır (Landvik 2001).

İnsanlarda E vitamini yiyeceklerdeki yağların, safra ve pankreatik esterazların miktarına bağlı olarak barsağın proksimal bölümünde tutulur. Şilomikronlar içinde depolanır ve özellikle ekzositoz yoluyla lenfatik sistemden dolaşıma katılır. (Azzi ve Stocker 2000). Absorbe edilen E vitaminin yaklaşık %75'i şilomikronların geri kalan kısmı da diğer lipoproteinlerin yapısına girer. Plazmada E vitamini lipoproteinler ve eritrositler tarafından taşınır. İnsanlarda E vitamini en çok yağdoku, karaciğer ve kas dokusunda bulunur. Temel atılımı da feçes yoluyla olur (Bhagavan 2001). Bitkilerdekinin aksine memelilerin dokularında sadece alfa-tokoferol bulunur. Yetişkin bir insan plazmasındaki toplam tokoferol konsantrasyonunun yaklaşık %87'si alfa-tokoferoldür. E vitaminin plazma değerleri 0,5 ile 1,6 mg/dl arasında değişmektedir. (Landvik 2001)

Günlük E vitamini gereksinimi tam olarak belirlenmemekle birlikte 15 mg (Chaney 2002) öneren çalışmalarla birlikte erkeklerde 10 mg, kadınlarda ise 8 mg'lık doz önerenler de vardır. E vitamini gereksinimi çoklu doymamış yağ asiti alımı arttığı zaman artar (Champe ve Harvey 1997).

Vitamin E eksikliği neredeyse tamamen prematür yeni doğan bebeklere özgüdür. Yetişkinlerde genellikle kusurlu lipid emilimi ve taşınmasıyla birliktedir. İnsanlarda E vitamini eksikliği belirtileri eritrositlerin peroksitlere karşı duyarlılığı ve anormal hücre membranlarının oluşmasıdır (Champe ve Harvey 1997). Nadir görülen bir hastalık olan "abetalipoproteinemi"de şilomikronların, çok düşük ve düşük yoğunluklu lipoproteinlerin yapısında bulunan "apoprotein B" sentezlenemez. Şilomikronlar olmadığı için E vitamini emilimi engellenir. Herhangi bir şekilde absorbe edilse bile düşük yoğunluklu lipoproteinler olmadığı için taşınması mümkün değildir. Derin periferal nöropati sonucu 12 yaş civarında ölümle sonuçlanabilir. E vitamini ile bu hastalık başarılı bir şekilde tedavi edilmektedir (Diplock 1994). Sürekli parenteral yolla beslenenlerde E vitamini konsantrasyonları genelde düşüktür. Parenteral lipid emülsiyonları temelde alfa-tokoferolden biyolojik olarak çok daha az aktif olan gamma ve delta tokoferol homologlarını içerir. Bu hastalara alfa-tokoferol ilavesi gerekli olmaktadır (Landvik 2001)

Diyetteki temel E vitamini kaynakları meyveler, sebzeler, çekirdek ve çekirdek yağlarıdır. Ayçiçeği çekirdeği, zeytinyağı ve badem zengin alfa-tokoferol kaynaklarıdır (Schneider 2005). Ayrıca, tereyağ, et, balık, tavuk, karaciğer, süt ve yumurtada bol miktarda bulunur (Bhagavan 2001).

Alfa-Tokoferol'ün Kollajen Kaybına Etkisi

Hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak yapılan çalışmalar alfa-tokoferolün enfeksiyon ve enflamasyon durumlarında kollajen yıkımını engelleyebileceğini göstermektedir (Asman ve ark 1994, Ricciarelli ve ark 1998, Azzi ve ark 2000, Rao ve Vijayakumar 2008). Sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan özefagus enfeksiyonundan hemen önce uygulanan tek doz alfa-tokoferol özefagus dokularındaki kollajen düzeylerinin daha yüksek olmasını sağlamıştır (Rao ve Vijayakumar 2008). *İn vitro* olarak deriden elde edilen fibroblastlar alfa-tokoferol varlığında "protein kinaz c" (PKC) aktivitesini baskılayarak kollajenaz gen yazılımını azaltmıştır (Ricciarelli ve ark 1998). Asman ve ark (1994) sıçanların boyun bölgesinde oluşturdukları deneysel granülasyon dokusuna alfa tokoferol ve sodyum selenit'i sekizinci gün başlayıp on sekizinci güne kadar uygulamış sonuçta kontrole göre daha az kollajen yıkımı tespit etmişlerdir. Alfa-tokoferol deri fibroblastlarında kollajenaz ekspresyonunu baskılayarak kollajen yıkımının daha az olmasını sağlamıştır (Azzi ve ark 2000). Ancak, alfa-tokoferolün yumuşak dokulardaki kollajen sentezini arttırdığı rapor edilmesine karşın, skar oluşumu ve karaciğer fibrozisi gibi durumlarda kollajen düzeyinde önemli oranda azalma yaptıkları tespit edilmiştir (Ehrlich ve ark 1971, Shen ve ark 2004). Alfa-tokoferolün yara iyileşmesi ve kollajen sentezi üzerine baskılayıcı etkisinin olduğu ve bunun istenmeyen skar oluşumunu engellediği gösterilmiştir (Ehrlich ve ark 1971). Karaciğer fibrozisinde oksidatif stres önemli bir mekanizmadır. Sıçanlarda karbon tetra klorürle oluşturulan akut karaciğer fibrozisinde uygulanan 250mg/kg dozundaki E vitamini ve 0.2mg/kg dozundaki selenyum tamir sürecinde hepatik fibrozisi azaltmıştır (Shen ve ark 2004).

Alfa-Tokoferol'ün Sitokin Düzeylerine Etkisi

Alfa-tokoferolün enfeksiyon, fibrozis, yaşlanma gibi durumlarda dokuda ve serumda proenflamatuvar sitokin düzeyleri üzerine etkili olabileceğini gösteren çalışmalar vardır (Godbout ve ark 2004, Walston ve ark 2005, Armutcu ve ark 2007, Barker ve ark 2009, Zeng ve ark 2009). Godbout ve ark (2004) farelerde üç günlük 20 mg α-tokoferol uygulamasının ardından intraperitoneal LPS enjeksiyonu yapılan çalışmada primer murin mikroglia ve beyin hücrelerindeki IL-6 düzeyleri daha az gözlenmiştir. Yaşlı bireylerdeki bazı hastalıkların sebebi yüksek IL-6 seviyeleri olabilir. Bu yaş grubundaki 619 katılımcıya verilen selenyum birinci ve ikinci yılların sonunda selenyum IL-6 seviyelerini önemli derecede düşürürken alfa-tokoferolün serum IL-6 seviyelerine bir etkisi olmamıştır (Walston ve ark 2005). Sıçanlarda bleomycin ile oluşturulan pulmoner fibroziste E vitamini 2 hafta boyunca 10mg/kg dozunda uygulanmış ve sonuçta plazma IL-1β ve IL-6 seviyeleri daha düşük bulunmuştur (Armutcu ve ark 2007). Diz ekleminden cerrahi operasyon geçirecek hastalara alfa tokoferol ve askorbik asitin birlikte uygulanması ameliyatın bir hafta sonrasında IL-4, IL-1β serum düzeylerini etkilemezken hem proenflamatuvar hem de antienflamatuvar özellikleri olan IL-6'nın serum konsantrasyonlarında önemli bir artış meydana gelmiştir (Barker ve ark 2009). Antioksidan özellikleri olan ve kanser tedavilerinde kullanılan "Dially Sulphide" tavşanlarda deneysel osteartritiste kıkırdak dokusundaki IL-1β ekspresyonunu baskılamıştır (Chen ve ark 2010).

Alfa-Tokoferol'ün iNOS Ekspresyonuna Etkisi

Alfa tokoferol'ün beyin, mide mukozası gibi periodontal doku dışında diğer yapılardaki iNOS pozitif hücre sayısını baskılayıcı yönde etkisi olduğu rapor edilmiştir (Ayasolla ve ark 2004, Khanduja ve ark 2004, Oh ve ark 2005, Hisao 2006). Mide mukozasının *Helicobacter pylori (H. pylori)* enfeksiyonu, hipoklorik asit, ilaçlar gibi bazı etkilerden ısıl şok proteinler "heat shock proteins" (HSP) sayesinde korunduğu ve artan HSP'nin hücre koruyucu etkisi sayesinde iNOS ekspresyonunu azalttığı rapor edilmiştir. Alfa-tokoferol uygulamasının da HSP27 düzeyini arttırarak iNOS ekspresyonunu baskıladığı saptanmıştır (Oh ve ark 2005). Alfa-tokoferol analoğunun sıçan beyin hücreleri üzerinde koruyucu etkiye sahip

olduğu ve bunu serbest radikaller, enflamasyon, NO ve apoptozisi baskılayarak gerçekleştirdiği ve iskemik hipoksik beyin hasarlarında tedaviye katkısı olabileceği rapor edilmiştir (Hisao 2006). Alfa-tokoferolün, astrosit ve mikroglia hücrelerinde sitokinle aktive olmuş iNOS ekspresyonunu azalttığı tespit edilmiştir. Bu etki çeşitli stres koşullarında aktive olan önemli bir transkripsyon faktör olan NFκB'ni baskılanmasıyla elde edilmiş ve Alzheimer gibi hastalıklarda faydalı olabileceğini ileri sürülmüştür (Ayasolla ve ark 2004). Khanduja ve ark (2004) sıçanlara 50mg/kg, 250mg/kg ve 1250mg/kg'lık farklı dozlar uygulayarak farklı vitamin E konsantrasyonlarının akciğerdeki alveol makrofajlarında LPS'ye bağlı artan iNOS ekspresyonuna etkisini değerlendirmişler ve daha yüksek dozlarla beklenen baskılamanın elde edilmediğini rapor etmişlerdir.

Alfa-Tokoferol'ün Apoptotik Hücre Ölümüne Etkisi

İnsanlardan elde edilen LDL molekülleri ve vasküler endotelyal hücre kültürü üzerinde *in vitro* olarak yapılan bir çalışmada alfa-tokoferol, sadece ROT'leri toplamakla kalmamış aynı zamanda vasküler endotelyal hücrelerdeki kaspaz-3 aktivitesini baskılayarak apoptozisten korumuştur (Uemura ve ark 2002). Alfa-tokoferolün nötrofillerde hücreiçi kaspaz-3 aktivitesini ve nötrofillerin spontan apoptozisini azalttığı rapor edilmiştir (Salerno ve ark 2007). Oksidatif stresin neden olduğu sinovitiste hücreler nekrozdan çok apoptozisle ortadan kaldırılmıştır. Ortama antioksidan özellikleri olan alfa-tokoferol eklendiğinde süperoksit anyonlarının neden olduğu bu hasara etkisi çok az olmuştur (Galleron ve ark 1999). Hiperlipidemik tavşanlara altı ay boyunca alfa-tokoferol verilmiş ve alfa-tokoferol verilmeyen grupla kıyaslandığında apoptozis, makrofaj infiltrasyonu, ve makrofajlarda üretilen ve plak rüptürüne neden olan MMP-3 sentezinin daha az olduğu bulunmuştur (Li ve ark 2004). Ramanathan ve ark (2006) sıçanlarda arsenikle oluşturulan toksisite için otuz gün boyunca ağız yoluyla günlük 400 mg/kg alfa-tokoferol uygulamış ve karaciğer ve böbrek dokularında apoptozis oranlarının azaldığını rapor etmiştir. Elde edilen bu sonuç vitamin E'nin lökositlerdeki TNF-α düzeyini düşürmesi ve buna bağlı olarak kaspaz-3'ün azalması ile ilişkili bulunmuştur. İnsan immün yetmezlik virüsü bulunan hastalardan elde edilen T lenfosit hücre kültürlerine E vitamini eklenmesi CD95L ekspresyonunu baskılamış

böylece bu hücrelerin CD95 ilişkili apoptozis ile ortadan kaldırılması engellenmiştir (Weber ve ark 2002).

1.5.3. Selenyum ve Alfa-tokoferol'ün Kombine Kullanımları

Selenyum ve E vitamini birçok çalışmada kombine olarak kullanılmaktadır. Sıçanlarda Keshan hastalığına bağlı olarak pankreastaki islet β hücrelerindeki gelişen değişimlerin tedavisinde 100 mg/kg alfa-tokoferol ve 0.22 mg/kg sodyum selenit uygulanmış ve sonuçta bu hücrelerde meydana gelen patolojik değişimler engellenmiş ve serum insülin düzeyleri normale dönmüştür (Tong ve Wang 1998). Alfa-tokoferol ve sodyum selenitin kombine uygulanması piliçlerde lipid peroksidasyonunu azaltarak karaciğerlerinde "malathion"'a bağlı dejeneratif değişikliklerin daha az olmasını sağlamıştır (Sodhi ve ark 2008). Giadinis ve ark (2000)'nın yaptığı çalışmada Chlamydia aşısına karşı gelişen antikor cevabı sodyum selenitin tek başına uygulandığı grupta alfa-tokoferolle kombine kullanıldığı gruba göre daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca alfa-tokoferolün tek uygulandığı grupta immün cevap da daha az gelişmiştir. Sıçanlarda diyetle hiperoksalüri oluşturulmasının ardından 30 gün boyunca bir gruba serum fizyolojik, başka bir gruba 400mg/kg dozunda E vitamini, diğer gruba 0.2mg/kg dozunda sodyum selenit bir diğer gruba da bunların kombinasyonu verilmiştir. Sonuçta bu kombinasyonun üriner risk faktörlerini azaltmış, lipid peroksidasyonunu engellemiş, oksalat sentezini azaltmıştır (Kumar ve Selvam 2003). Sıçanlarda cisplatin ile böbrek, karaciğer ve lens dokularında oluşan oksidatif hasara eş zamanlı olarak selenyum ve yüksek doz E vitamini uygulaması olumlu sonuçlar doğurmuştur (Nazıroğlu ve ark 2003). Selenyum ve E vitamini uygulaması sıçanlarda genel anestezik bir madde olan halotana bağlı hepatik hücresel yaralanmayı önlemekte kullanılabilir (Karakılçık ve ark 2003).

1.5.4. Antioksidan-Antienflamatuvar Ajanların Deneysel Periodontitis Tedavisinde Kullanımı

Deneysel periodontitis oluşturulan sıçanlara antioksidan bir madde olan "baicalin" verilmiş ve sonuçta daha az kemik kaybı, daha fazla kolajen lifi ve iNOS ile siklooksijenaz-2 düzeylerinde önemli azalma gözlenmiştir. (Cai ve ark 2008).

Deneysel periodontitis oluşturulan başka bir çalışmada, sıçanlarda bir antioksidan olan "tempol"ün uygulanmasının enflamasyon parametrelerini önemli derecede azalttığı saptanmıştır (Di Paola ve ark 2005). Antienflamatuvar ve antibakteriyel özellikli "Carvacrol" sıçanlarda deneysel periodontitis sonucu periodontal ligament hücrelerinde oluşan yıkımın daha az olmasını sağlamıştır (Botelho ve ark 2009). Diğer taraftan, köpeklerde çekim soketine uygulanan melatonin normalde yüksek çıkan oksidatif stres değerlerini önemli derecede düşürmüştür. (Cutando ve ark 2007a). Deneysel periodontitis oluşturularak kakaodan zengin diyetle beslenen sıçanlarda kontrol grubuna göre serum reaktif oksijen metabolitleri, serum TNF-α, periodontal enflamasyon ve dişetindeki 8-OHdG seviyeleri daha düşük bulunmuştur (Tomofuji ve ark 2009).

Parrish ve arkadaşlarının (1977) sıçanlarda sütur bağlayarak oluşturdukları deneysel periodontitis modelinde sekiz hafta boyunca yeterli, düşük ve yüksek dozlardaki E vitamini diyeti uygulanmış ve ataşman kaybı, alveol kemik kaybı ve enflamatuvar hücre sayısı değerlendirilmiş sonuçta E vitamininden yoksun diyetle beslenen grupta daha fazla yıkım olmamıştır. Asman ve arkadaşlarının (1994) yaptığı bir çalışmada sıçanların boyun bölgesinde oluşturulan deneysel granülasyon dokusuna alfa tokoferol ve sodyum selenit sekizinci gün başlayıp on sekizinci güne kadar uygulanmış sonuçta bu maddelerin fagositik hücrelerce oluşturulan serbest radikalleri baskılaması sonucunda kollajen yıkımında azalma sağladığı bildirilmiştir. Albino sıçanlarda alt keser dişlere gingivektomi yapılarak α-tokoferol asetat verilmesi vitamin verilmeyen gruba göre yara iyileşmesinin daha çabuk olmasını sağlamıştır (Kim ve Shklar 1982).

Periodontal doku yıkımının birincil etkeni bakteriyel dental plak biyofilm olmasına karşın etiyolojisinde genetik, kazanılmış ve çevresel faktörlerin önemli rol oynadığı enflamatuvar bir hastalıktır. Doku yıkımında enflamasyon artışı ile birlikte sitokinlerin ve buna bağlı olarak iNOS ekspresyonunun ve apoptozise bağlı hücre ölümünün arttığı gösterilmiştir (Hughes ve ark 2006, Reynold ve ark 1997, Gamonal ve ark 2001). Periodontitisin tedavisinde bakteriyel biyofilmin uzaklaştırılması ve anti-enfektif yaklaşımlar gibi konvansiyonel tedavilerin yanı sıra, son zamanlarda, konak savunmasının düzenlenmesi amacıyla anti-enflamatuvar sitokinler, ilaçlar, vitaminler ve antioksidanlar gibi uygulamalar üzerine olan ilgi artmıştır. Literatürde,

antioksidan ve antienflamatuvar özellikte bir mineral olan sodyum selenit ve E vitamininin en önemli üyesi olan alfa-tokoferol'ün bazı enflamatuvar hastalıklarda olumlu etkilerini gösteren araştırmalar vardır (Sugimoto ve ark 2000, Chung 2005, Zeng 2009). Ancak bu uygulamaların periodontal doku yıkımı üzerine etkisini değerlendiren çalışmalar sınırlı sayıdadır (Parrish ve ark 1977, Kim ve Shklar 1982). Bu çalışma antioksidan ve antienflamatuvar uygulamaların doku yıkımında artış gösteren sitokin, iNOS ve apoptotik hücre ölümüne etkisi olabileceği hipotezinden yola çıkılarak planlanmıştır. Araştırmanın amacı, ligatürle deneysel periodontitis oluşturulan sıçanlarda dört hafta süresince sodyum selenit ve alfa-tokoferol'ün tek başına veya kombine kullanımlarının alveoler kemik kaybı, dişeti dokusu kollajen lif sayısı, serum sitokin düzeyleri ve immünohistokimyasal olarak dişeti iNOS ve CD95 ekspresyonları üzerine etkilerini araştırmaktır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Deneysel Hayvanlar

Bu araştırma için Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi Etik Kurulu'ndan onay alındı (Ek-A). Sıçanlar üzerine uygulanan tüm işlemler aynı araştırma merkezinde gerçekleştirildi. Çalışmada her biri ortalama 300±30 gr. ağırlığında, 40 adet Sprague-Dawley türü sıçan kullanıldı. Sıçanlar çeşme suyu ve standart sıçan yemi ile beslendi. Her bir kafeste beş hayvan olacak şekilde yerleştirildi ve 20-22^{o}C'lik sabit oda sıcaklığında tutulmaları sağlandı.

2.2. Çalışma Dizaynı

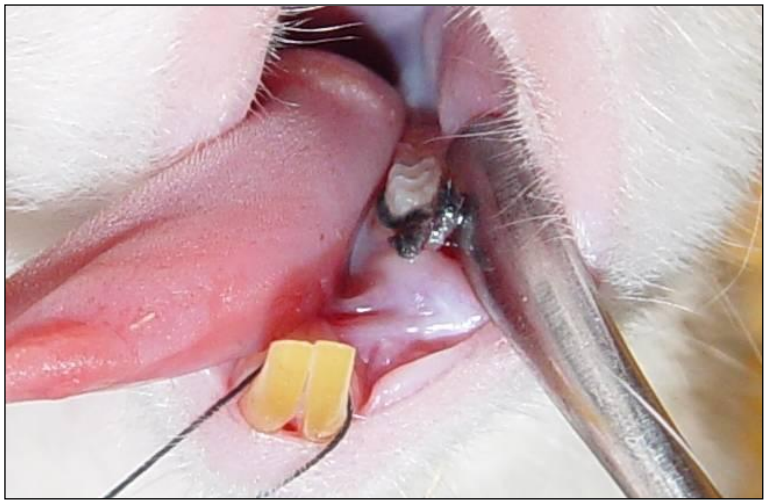
Araştırmaya dahil edilen sıçanların tamamına intraperitonal (IP) olarak ketasol (30 mg/kg, İnterhas AŞ, Türkiye) ve rompun (5 mg/kg, Bayer, İstanbul) uygulandı. Anestezi sağlandıktan sonra sol alt birinci ve ikinci molar dişleri arasından 3/0 ipek sütur (Doğsan Tıbbi Malzeme Sanayi AŞ, Türkiye) materyali geçirildi. Birinci molar dişin etrafında subgingival olarak yerleştirilerek sıkıca düğümlendi (Resim 2.1). Toplam 40 sıçan her grupta 10 adet sıçan olmak üzere rastgele dört gruba ayrıldı:

Grup A (K): Kontrol (K) grubuna dört hafta boyunca IP olarak her gün günde bir kez serum fizyolojik enjekte edildi.

Grup B (Se): Sodyum Selenit (Sodium Selenite, Na_2SeO_3, Sigma-Aldrich, S 1382, USA) distile suda çözülüp 0,5 ml serum fizyolojikle (0,2 mg/kg) (Zafar ve ark 2003) IP olarak günde bir kez dört hafta boyunca her gün uygulandı.

Grup C (αT): İntraperitonal olarak alfa-tokoferol asetat (Sigma-Aldrich, T 3001, USA) alkolde çözülüp 0,5 ml serum fizyolojikle (40mg/kg) (Sadir ve ark 2007) günde bir kez dört hafta uygulandı.

Grup D (Se+αT): Sıçanlara IP olarak Sodyum Selenit (0,2 mg/kg) ve alfa-tokoferol asetat (40mg/kg) kombine olarak 0,5 ml serum fizyolojikle günde bir kez dört hafta uygulandı.



Resim 2.1. Sıçanların sol alt 1. molar dişine sütur bağlanmış görüntüsü

Tüm enjeksiyonlar sıçanlara süturların bağlandığı gün uygulanmaya başlandı. Serum fizyolojik, sodyum selenit ve alfa-tokoferol uygulamalarının sabah aynı saatlerde yapılmasına dikkat edildi.

Dört haftanın sonunda sıçanlara ketamin (30 mg/kg) ve rompun (5 mg/kg) uygulanarak anestezi sağlandı ve 10 ml'lik enjektörle "intrakardiyak" olarak kalplerinden kan alındı. Alınan kanlar 8 ml'lik jelli tüpler (Vacutest, Kima, İtalya) içerisine konulduktan sonra 10 dk. boyunca santrifüj edildi (3000 devir/dk) (Nüve NF-1000 R İstanbul-Türkiye). Örnekler serum ve plazma olarak ayrıldıktan sonra serum kısmı eppendorf tüplere alındı ve analiz edileceği güne kadar -80^0C'de saklandı. Sıçanların kanı alındıktan sonra yüksek doz anestezi altında kurban edilerek "sakrifikasyon" işlemi gerçekleştirildi (Resim 2.2) ve alt çeneleri çıkarılarak %10'luk formol solüsyonuna konuldu.



Resim 2.2. Sıçanların sakrifikasyonundan sonra mandibulanın çıkarılması

2.3. Histolojik ve İmmünohistokimyasal Değerlendirme

Deneysel araştırmanın histolojik ve immünohistokimyasal değerlendirilmesi Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

2.3.1. Dokuların Hazırlanışı

Alınan tüm örnekler önce %10'luk formik asit solüsyonunda iki gün bekletilerek dekalsifiye edildi. Dekalsifikasyon işleminden sonra sıçanlardan elde edilen alt çene birinci ve ikinci molar dişler arasında sütur atılan bölgeyi içerecek şekilde 5 mm kalınlığında örnekler hazırlandı. Bu örnekler kasetlenerek ototeknikon cihazında (Leica ASP 300) rutin doku takip işlemine alındı. Doku takip işlemi tamamlanan örnekler parafin bloklara gömüldü. "Hematoksilen-eozin" ve "Mason trichrom" boyaları, "CD95" ve "iNOS" immünohistokimya boyamaları yapılmak üzere otomikrotomda lizinli lamlara dörder adet 5 μm kalınlığında kesitler alındı.

2.3.2. İmmünohistokimyasal inceleme

Parafin bloklardan mikrotom yardımıyla (sliding microtome, Leica Jung SM 2000 Almanya) beş μm kalınlığında alınan lamdaki örnekler 56 - 58^{0}C' de etüvde 16 saat bekletildi. 30 dk ksilen, 15 dk saf alkol, 15 dk %96'lık alkolde bekletildikten sonra distile suyla iki kere yıkandı. Sitrat ph 6 tamponla basınçlı ısıtıcıda "retraver" aşaması için 20 dk kaynatıldı. Basınçlı buhar ortamından sitrat tampondan çıkan lamlar bulundukları solüsyon içinde ve oda ısısında 20 dk soğumaya bırakıldı. Lamların kurumamasına dikkat edilerek doku kenarları hidrofobik kalemle çizildi.

Çizilen lamlar fosfatla tamponlanmış solusyon "phosphate buffered saline" (PBS) içine alınarak beş dakika bekletilip boyama işlemine geçildi. Hidrojen peroksitte 20 dk bekletildi, distile suyla yıkandı ve ph7.4 olan PBS'de beş dakika bekletildi. Ultra viyolede blok 5 - 15 dk tutuldu ve önce distile suyla daha sonra da PBS ile yıkandı. Ara verilmeden nemli ortamda bir saat antikora tabi tutuldu. Antikorların fazlaları distile suyla yıkanarak PBS'de beş dakika bekletildi. "Ultra Tek-Polyvalent Biotinylated Antibody" damlatılıp 20 dk bekletildi, yıkanıp ve PBS' de beş dakika tutuldu. UltraTek "horseradish peroxidase" damlatıldı 20 dk bekletilip, yıkanıp beş dakika PBS'de tutuldu. Daha sonra"3-amino-9-ethyl carbazole" kromojen damlatıldıktan sonra 15 dk bekletilip yıkandı ve distile suya alındı. Hematoksilen eozinle boyanarak bir – iki dakika beklendi. Çeşme suyunda beş dakika yıkanarak distile sudan geçirildi. Ortalama 15 - 30 saniye amonyaklı suda durdurduktan sonra iki defa distile suyla yıkandı. Su bazlı kapama malzemesi olan "Large Volume Vision Mount" ile camlar lamelle kapatıldı.

2.3.3. Parametrelerin değerlendirilmesi

Boyanan preparatlar ışık mikroskobu (Nicon Eclipse E 400 USA) ile incelendi. Her örnek için mikroskoba bağlı fotoğraf makinesi (Nikon Coolpix 5000 Japonya) ile görüntüler alındı. Olgu görüntüleri alınırken, aynı zamanda ve aynı büyütmede, uzunluk kalibrasyonu için "Nikon Stage Micrometer Type A (MBM11100)" (Japonya) görüntüsü de alındı. Tüm fotoğraflar PC ortamına aktarıldı ve "Clemex Vision Lite 3,5" görüntü analizi sistemiyle (Clemex Technologies Inc. Guimond, Longueuil, Kanada) değerlendirildi. İlk önce Nikon Stage Micrometer Type A (MBM11100) fotoğrafı ile uzunluk kalibrasyonu yapıldı. Daha sonra mine-sement sınırı ve alveolar kemik arasındaki mesafe alveoler kemik kaybı (AKK) olarak µm cinsinden belirlendi ve her olgu için görüntü analizi sistemi ile hesaplandı. Birleşim epitelinin altkısmındaki bağdokuda kollajen lif sayısı, iNOS ve CD95 pozitif boyanan hücre sayısı değerlendirildi. Bu amaçla her olguda benzer alanlar seçilerek görüntü analizi sistemi ile 0,1 mm^2'lik alan belirlendi. Seçilen alandaki pozitif boyanan hücreler ve kollajen lifleri işaretlenerek görüntü analizi sistemine otomatik olarak saydırıldı. Hasarlı hücreler değerlendirme dışı tutuldu. Okuyucu vakanın özelliklerini ve boyanan belirleyicileri bilmeden değerlendirdi.

2.4. Biyokimyasal Analiz:

Bu araştırmanın biyokimyasal analizleri Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Mehmet Serpek Laboratuvarı'nda geçekleştirildi. Serum örnekleri IL-1β, IL-6, IL-4 konsantrasyıonları ELISA kitleriyle değerlendirildi.

2.4.1. Serum 1L-1β düzeylerinin belirlenmesi

Serum 1L-1β analizleri için sıçanlar için spesifik IL-1β ELISA ticari kitleri (Invitrogen KRC0012, USA) kullanıldı. Kit içerisinde verilen reaktiflerin prosedüre 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 sulandırmalarda 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 bırakıldı. İnkübasyonun ardından yıkama tamponu ile dört kez yıkanan plaklara 100 µl. Biotin konjugat (Biotinil- anti-IL1β) verilerek bir saat oda ısısında beklemeye bırakıldılar. Tekrar dört kez yıkanan plaklarda biotin konjugatına bağlanması amacıyla bütün yuvalara 100 µl streptavidin peroksidaz enzimi verildi ve tekrar 30 dk 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 mikroplate reader (Microquant Biotek Inc. USA) kullanılarak belirlendi.

2.4.2. Serum IL-6 düzeylerinin belirlenmesi

Serum IL-6 konsantrasyonlarının belirlenmesi amacıyla sıçanlar için spesifik IL-6 ticari kitleri kullanıldı (Invitrogen KRC0062, USA). Kitte verilen reaktiflerin prosedürüne 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 bekletildi. Daha sonra plaklar dört kez yıkama tamponu ile yıkandı ve yuvalara 100 µl biotin konjugat verildi. Oda ısısında bir 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. Oluşan rengin şiddeti ve dolayısıyla serum IL-6 düzeyleri absorbansların 450 nm'de mikroplak okuyucu "mikroplate reader" (Microquant Biotek Inc USA) aracılığıyla belirlendi.

2.4.3. Serum IL-4 düzeylerinin belirlenmesi

Serum IL-4 konsantrasyonlarının belirlenmesi amacıyla sıçanlar için spesifik IL-4 ELISA kitleri (RayBio, ELR-IL4-001, USA) kullanıldı. Kit içerisinde bildirilen reaktiflerin prosedürlere 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 standart hazırlandı.

Plak ve serumların oda ısısına getirilmesinin ardından, plağın uygun yuvalarına 100 µl standart ve serumlar verildi. Plakların 2,5 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. enzim olan Streptavidin peroksidaz verildi ve 45 dk beklemeye bırakıldılar. İkincil antikora bağlanan enzimlerin renk reaksiyonunun görülebilmesi amacıyla peroksidaz enziminin substratı olan tetrometil benzidin 100'er µl yuvalara eklendi. Karanlıkta 30 dk beklemeye bırakılan plaklara 50 µl stop solüsyon verilerek absorbanslar 450 nm'de mikroplate reader (Microquant Biotek Inc USA) aracılığıyla belirlendi.

2.5. Verilerin İstatistiksel Analizi:

Bu çalışmaya ait veriler paket program (SPSS 15.0) kullanılarak analiz edildi. Gruplar arasında imünohistokimyasal ve biyokimyasal parametreler yönünden farklılığın değerlendirilmesi için Kruskal-Wallis Testi yapıldı. İstatistiksel olarak önemli fark gösteren değerler için Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi yapıldı. İstatistiksel değerlendirme için $p<0,05$ anlamlı olarak kabul edildi.

3. BULGULAR

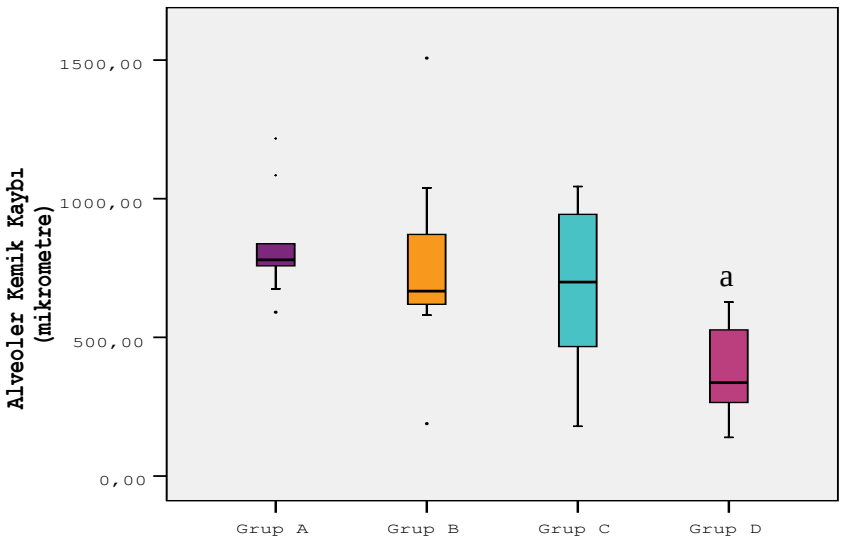
Çalışmaya dahil edilen 40 sıçandan iki tanesi Grup B *(Se)*, bir tanesi de Grup C *(αT)*'den olmak üzere toplam üç sıçan kaybedildi ve çalışma 37 sıçanla tamamlandı. İmmünohistokimyasal değerlendirmede bozulan örneklerin analizi yapılamadı. Tablo 3.1.'de sıçanların alveoler kemik kaybı (AKK) (µm), kollajen lif sayısı, CD 95 ve iNOS monoklonal antikoru ile pozitif boyanan hücre sayısı ortalama (ort), standart sapma (Ss), ortanca, en küçük "minimum" (Min) ve en büyük "maksimum" (Maks) olarak verildi.

Tablo 3.1. Grup A *(K)*, Grup B *(Se)*, Grup C *(αT)* ve Grup D *(Se+αT)* için alveoler kemik kaybı (AKK), kollajen lif sayısı, iNOS ve CD95 monoklonal antikoru ile pozitif boyanan hücre sayıları

	A	B	C	D	Kruskal-Wallis testi
AKK (µm)					
n	9	7	8	10	**0,002**
Ort±Ss	832,9±196,6	763,3±411,6	680,3±302,2	385,7±158,1	
Ortanca	779,4	666,8	699,4	336,6[a]	
Min-Maks	590,6-1217,0	188,8-1507,0	179,2-1044,0	139,1-626,9	
Kollajen					
n	8	7	9	7	0,095
Ort±Ss	5,75±1,83	7,14±2,85	7,55±3,84	11,85±6,59	
Ortanca	5,00	8,00	6,00	9,00	
Min-Maks	4,00-9,00	3,00-11,00	4,00-14,00	6,00-24,00	
iNOS					
n	7	7	7	8	**0,005**
Ort±Ss	47,85±10,33	25,28±6,89	33,57±9,65	32,87±6,89	
Ortanca	51,00	27,00[a]	35,00	31,00	
Min-Maks	35,00-59,00	15,00-33,00	16,00-45,00	25,00-43,00	
CD95					
n	5	7	5	6	0,106
Ort±Ss	29,80±8,16	17,71±7,43	23,00±9,97	17,66±5,98	
Ortanca	31,00	16,00	27,00	15,50	
Min-Maks	18,00-39,00	9,00-31,00	11,00-34,00	12,00-27,00	

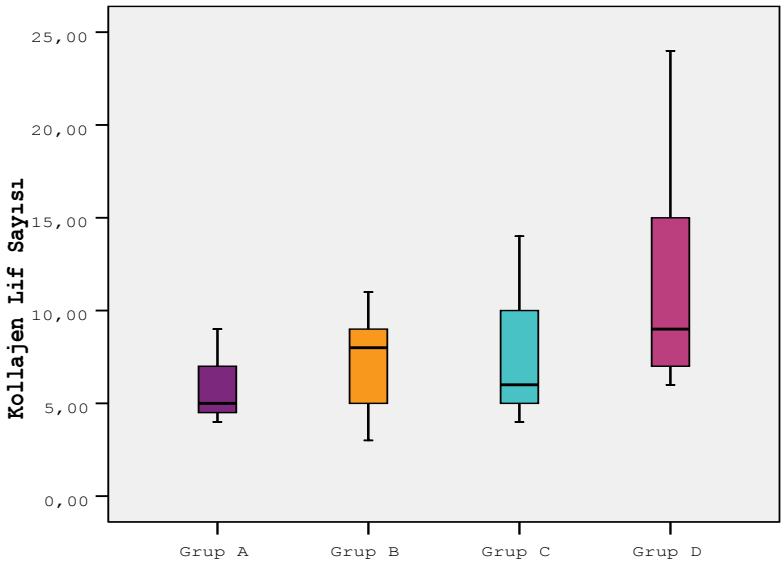
a; Kontrol grubuna göre farklılık, Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testine göre; p<0,05. Ort. Ortalama, Ss: Standart Sapma, Min: Minimum, Maks: Maksimum

Ayrıca, AKK (Resim 3.1.) ve kollajen lif sayısının (Resim 3.2, 3.3, 3.4, 3.5), iNOS (Resim 3.6, 3.7, 3.8, 3.9) ve CD95 monoklonal antikoru ile boyanan hücrelerin (Resim 3.10, 3.11, 3.12, 3.13) görüntüleri verildi.



Grafik 3.1. Grup A *(K)*, Grup B *(Se)*, Grup C *(αT)* ve Grup D *(Se+αT)* için *AKK (µm)*düzeyleri.

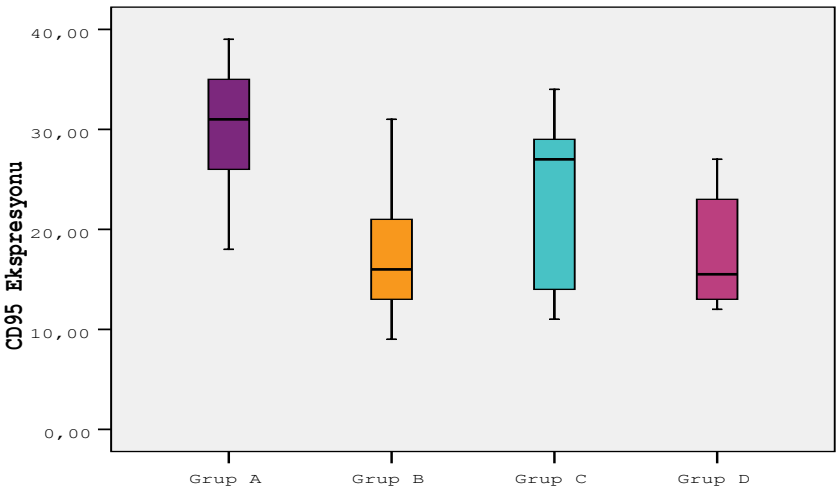
a; Kontrol grubuna göre farklılık, Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testine göre; p<0,05.



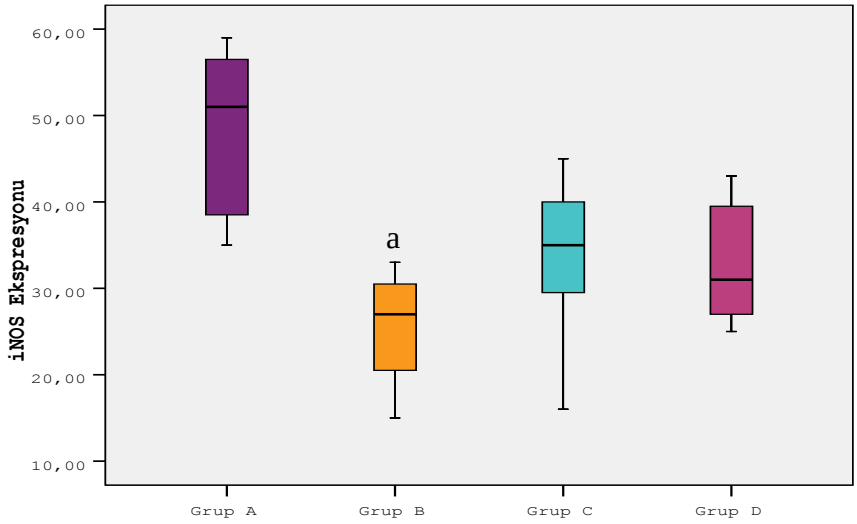
Grafik 3.2. Grup A *(K)*, Grup B *(Se)*, Grup C *(αT)* ve Grup D *(Se+αT)* için dişeti kollajen lif sayıları.

Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testine göre gruplar arasında fark yoktur p>0,05.

Grup A *(K)*'daki AKK değerleri Grup D *(Se+αT)*'ye göre daha yüksek bulundu (Grafik 3.1, p<0,05). Dişeti kollajen miktarı (Grafik 3.2, p<0.05) ve pozitif boyanan CD95 hücre sayısı gruplar arasında farklılık göstermedi (Grafik 3.3, p>0.05). Grup B *(Se)*'deki iNOS düzeyi kontrol grubuna göre daha düşük olarak bulundu (Grafik 3.4, p<0,05). Ayrıca, Grup D *(Se+αT)*'deki grubundaki pozitif boyanan iNOS miktarı kontrol grubuna kıyasla daha düşük olma eğilimindeydi; ancak istatistiksel olarak farklı değildi (Grafik 3.4, p=0.017).



Grafik 3.3. Grup A *(K)*, Grup B *(Se)*, Grup C *(αT)* ve Grup D *(Se+αT)* için CD95 ekspresyon düzeyleri (p>0,05).
Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testine göre gruplar arasında fark yoktur p>0,05.



Grafik 3.4. Grup A *(K)*, Grup B *(Se)*, Grup C *(αT)* ve Grup D *(Se+αT)* için iNOS ekspresyon düzeyleri.

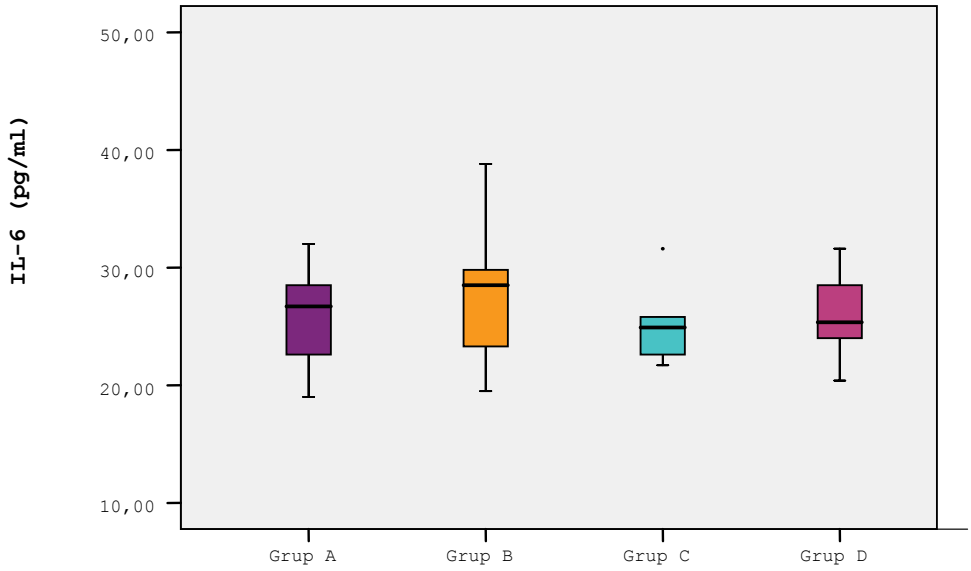
a; Kontrol grubuna göre farklılık, Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testine göre; p<0,05.

Tablo 3.2.'de sıçanların serum IL-6, IL-1β ve IL-4 konsantrasyonları verildi. Serum konsantrasyonları gruplar arasında farklı değildi (p>0,05).

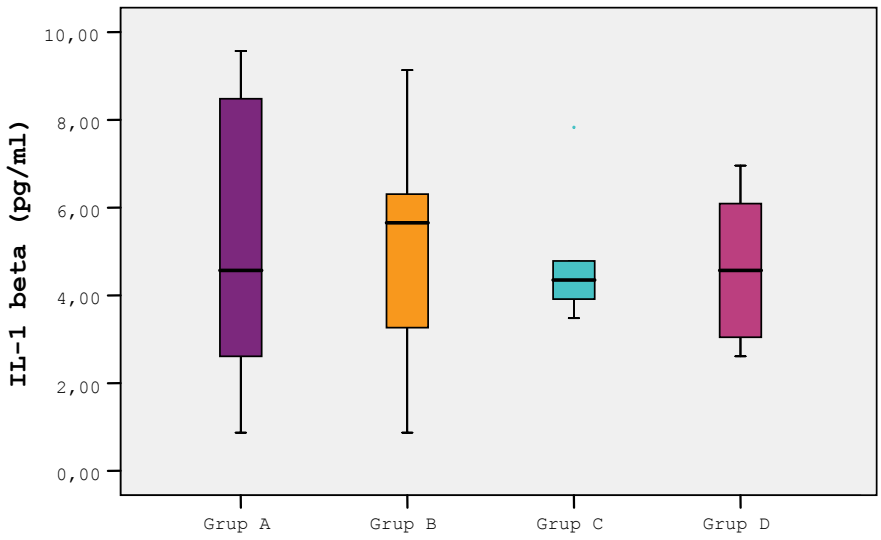
Tablo 3.2. Grup A *(K)*, Grup B *(Se)*, Grup C *(αT)* ve Grup D *(Se+αT)* için serum IL-6, IL-1β ve IL-4 konsantrasyonları.

	A	B	C	D	Kruskal Wallis testi
IL-6					
n	9	8	9	10	0,840
Ort±Ss	25,62±4,62	27,68±5,89	31,54±20,22	25,79±3,42	
Ortanca	26,70	28,50	24,90	25,35	
Min-Maks	19,00-32,00	19,50-38,80	21,70-84,90	20,40-31,60	
IL-1β					
n	8	8	8	8	0,979
Ort±Ss	5,21±3,27	5,05±2,54	4,67±1,35	4,62±1,69	
Ortanca	4,56	5,65	4,34	4,56	
Min-Maks	0,87-9,57	0,87-9,13	3,48-7,83	2,61-6,96	
IL-4					
n	9	7	9	9	0,587
Ort±Ss	0,26±0,03	0,26±0,05	0,26±0,07	0,28±0,04	
Ortanca	0,26	0,25	0,24	0,28	
Min-Maks	0,21-0,32	0,20-0,34	0,18-0,41	0,22-0,35	

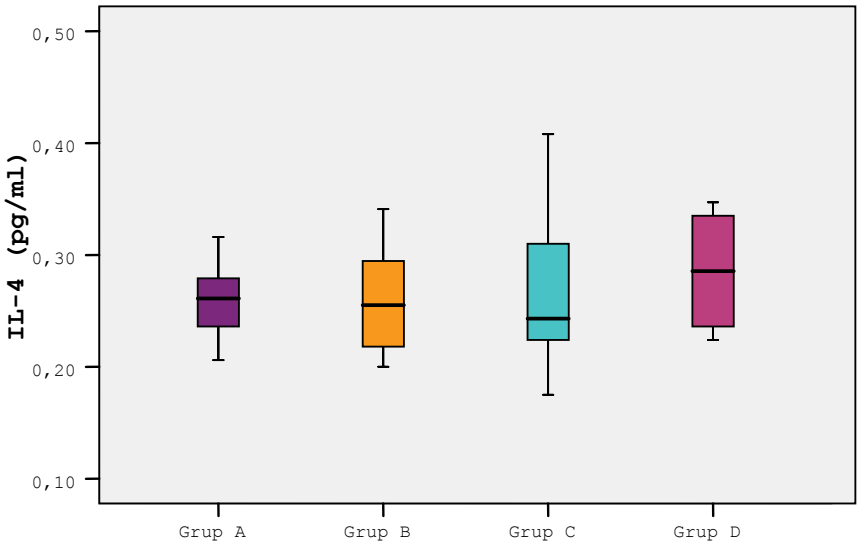
Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testine göre gruplar arasında fark yoktur; p>0,05.
Ort. Ortalama, Ss: Standart Sapma, Min: Minimum, Maks: Maksimum



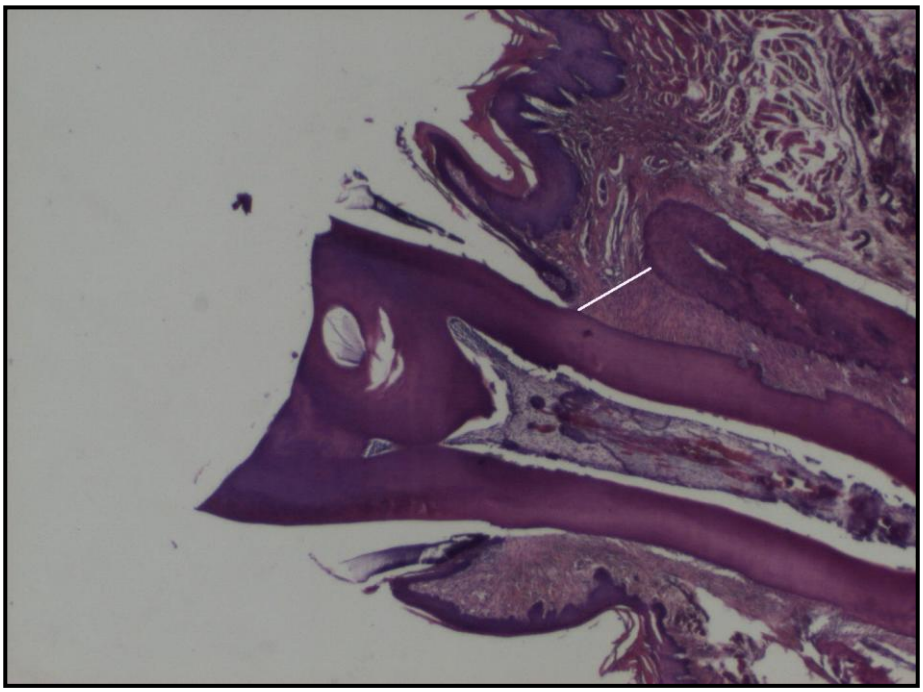
Grafik 3.5. Grup A *(K)*, Grup B *(Se)*, Grup C *(αT)* ve Grup D *(Se+αT)* için serum IL-6 konsantrasyonları.
Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testine göre gruplar arasında fark yoktur; p>0,05.



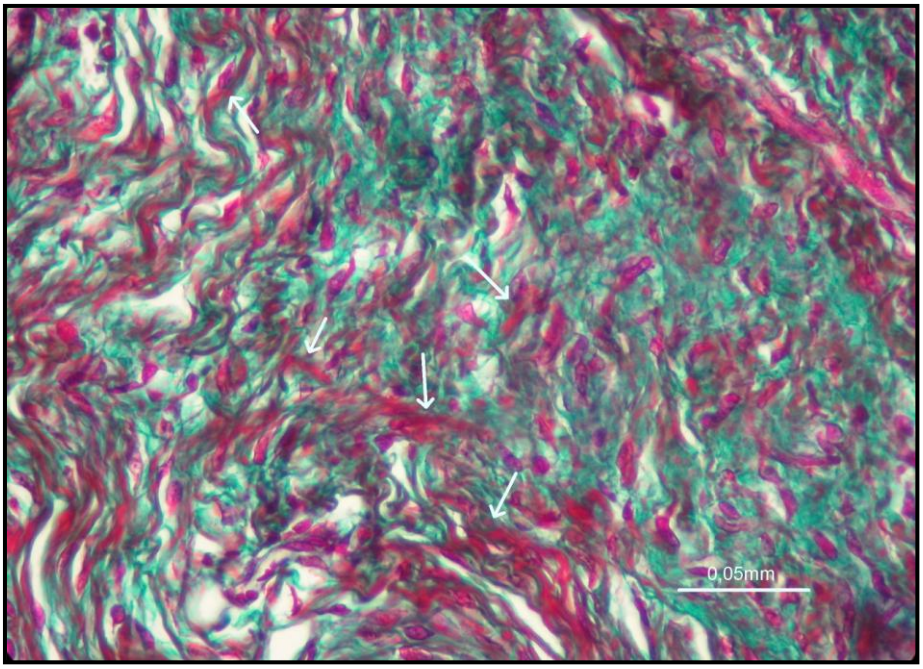
Grafik 3.6. Grup A *(K)*, Grup B *(Se)*, Grup C *(αT)* ve Grup D *(Se+αT)* için serum IL-1β konsantrasyonları.
Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testine göre gruplar arasında fark yoktur; p>0,05.



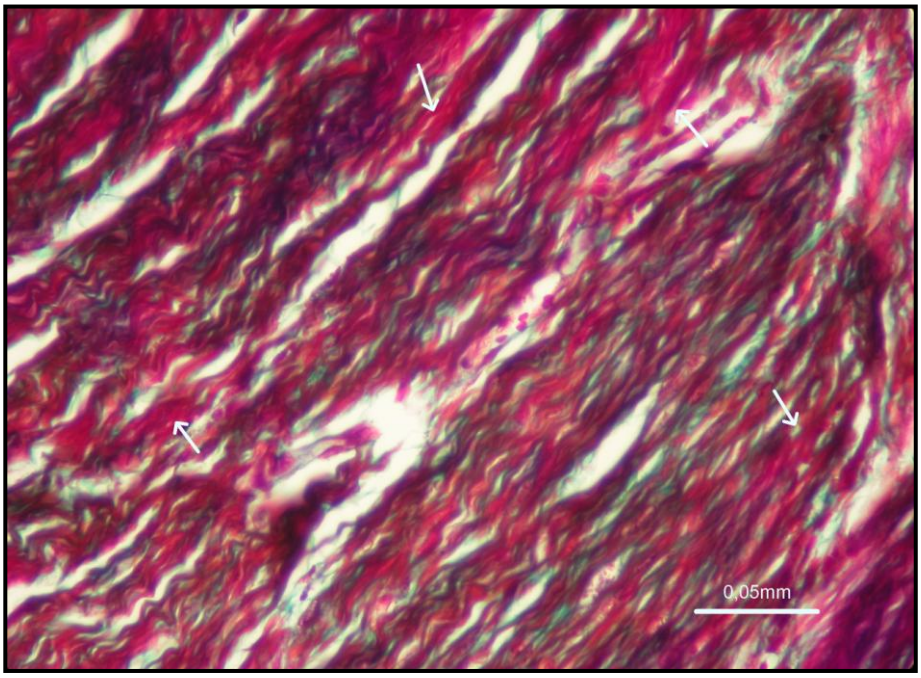
Grafik 3.7. Grup A *(K)*, Grup B *(Se)*, Grup C *(αT)* ve Grup D *(Se+αT)* için serum IL-4 konsantrasyonları.
Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testine göre gruplar arasında fark yoktur; p>0,05.



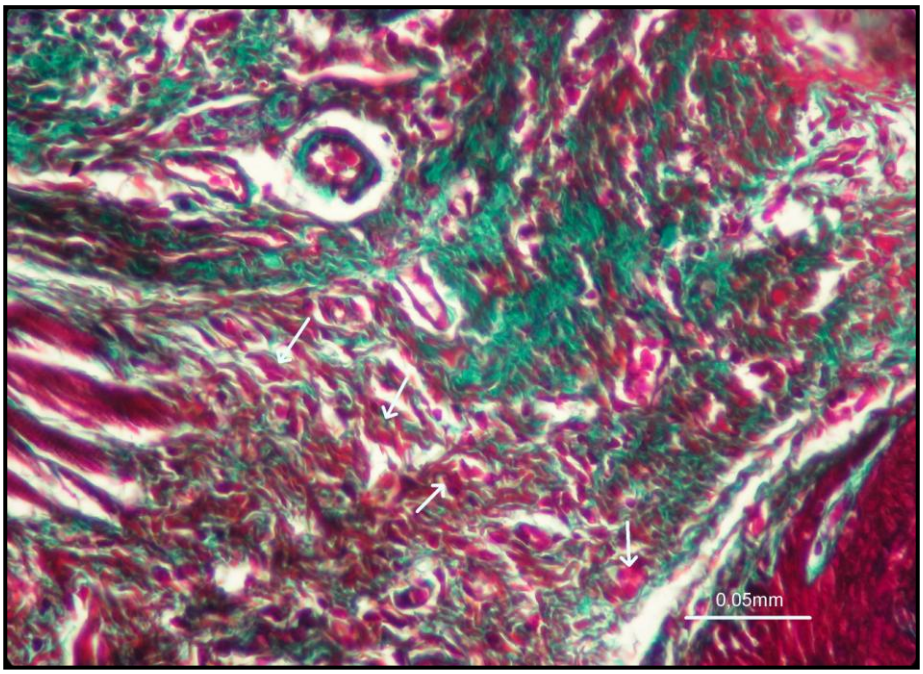
Resim 3.1. Hematoksilen-Eosin boyanmış kesitlerdeki morfometrik görüntü ve alveoler kemik kaybı ölçümü.



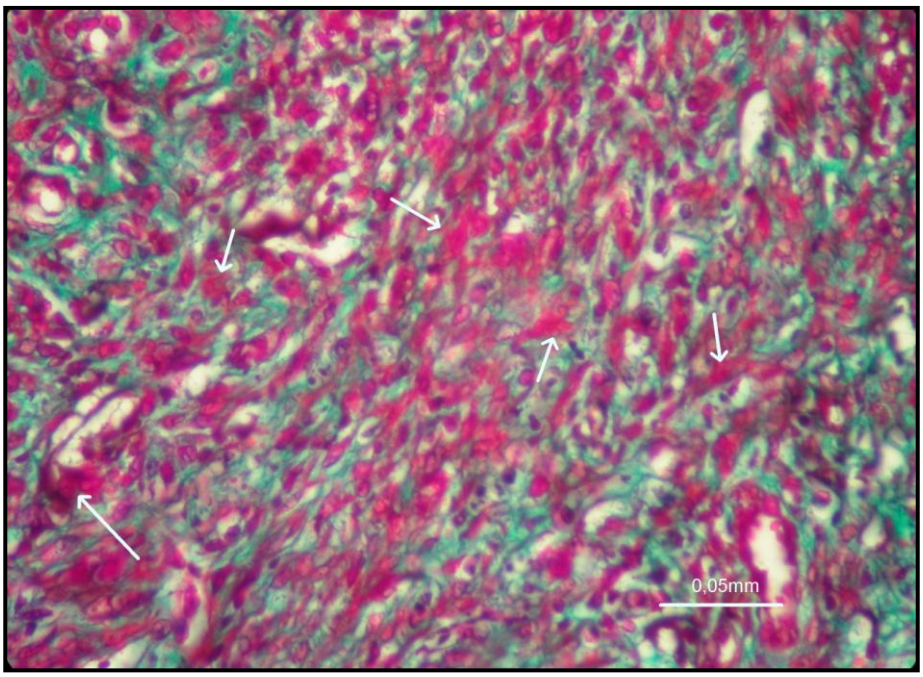
Resim 3.2. Grup A *(K)*'da dişeti kollajen liflerinin "Mason trichrom" ile boyanmış görüntüsü.



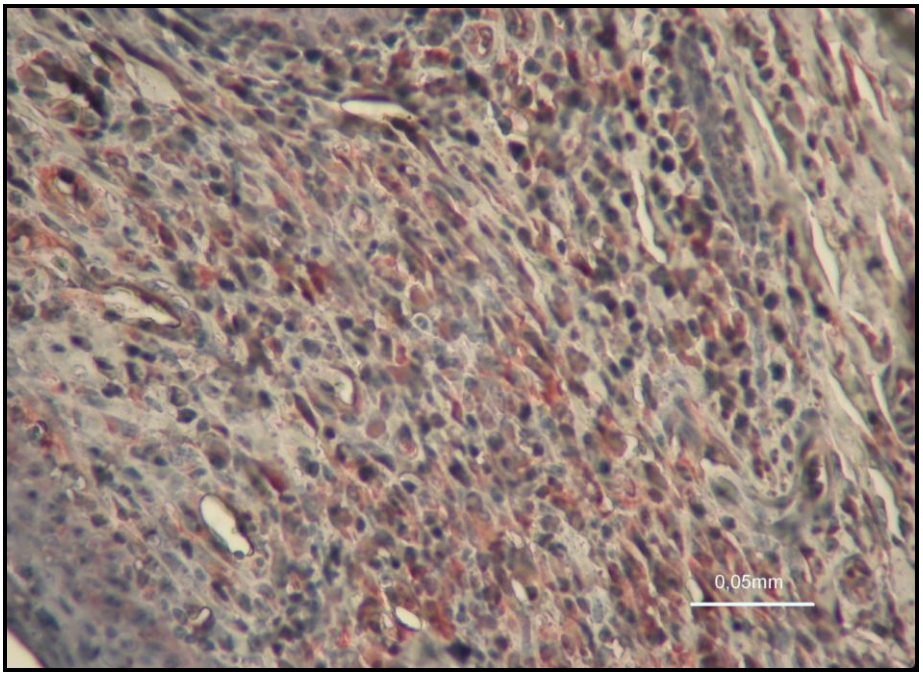
Resim 3.3. Grup B *(Se)*'de dişeti kollajen liflerinin "Mason trichrom" ile boyanmış görüntüsü.



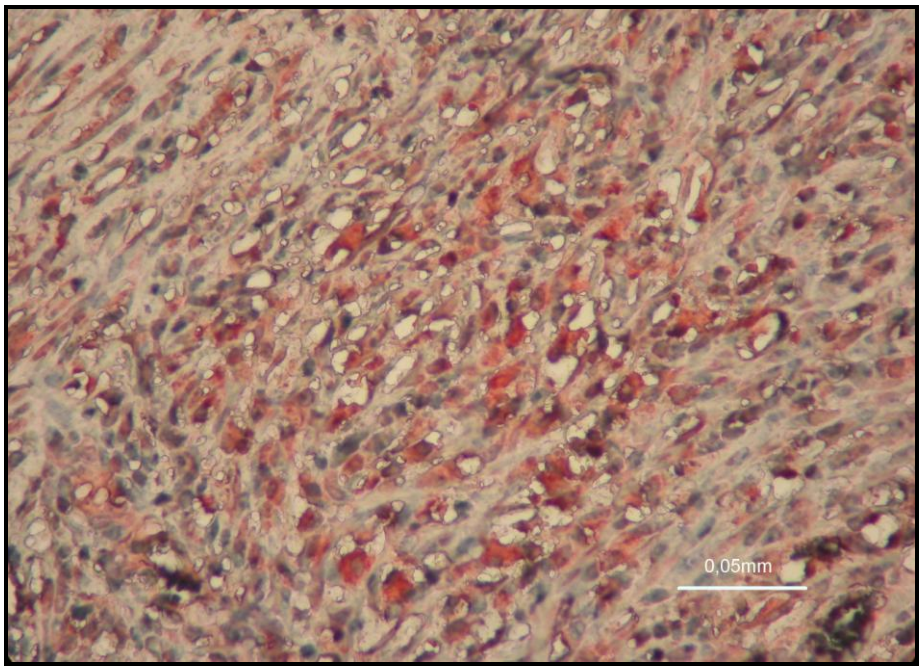
Resim 3.4. Grup C *(αT)*'de dişeti kollajen liflerinin "Mason trichrom" ile boyanmış görüntüsü.



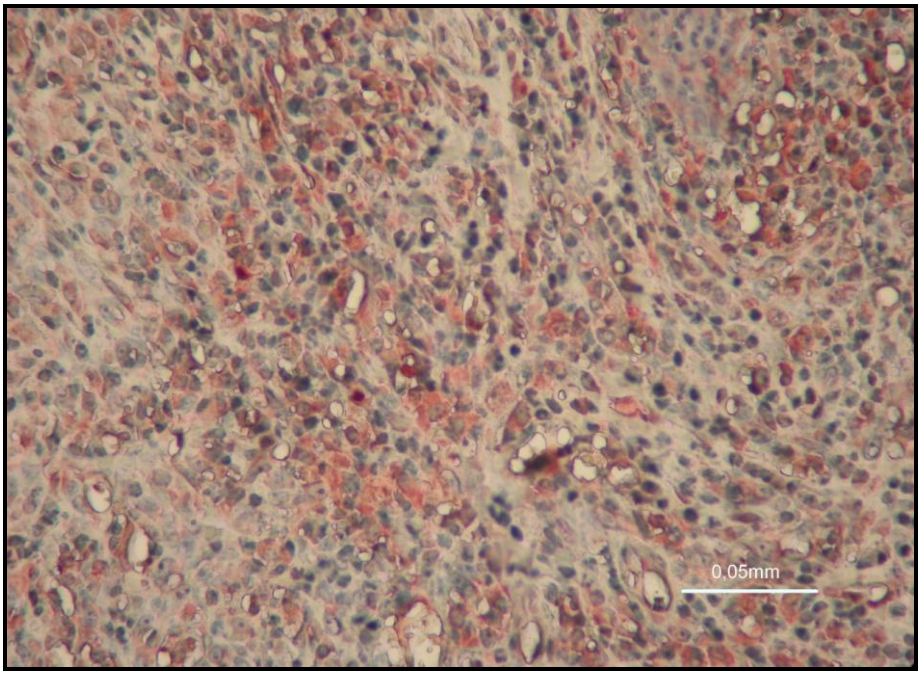
Resim 3.5. Grup D *(Se+αT)*'de dişeti kollajen liflerinin "Mason trichrom" ile boyanmış görüntüsü.



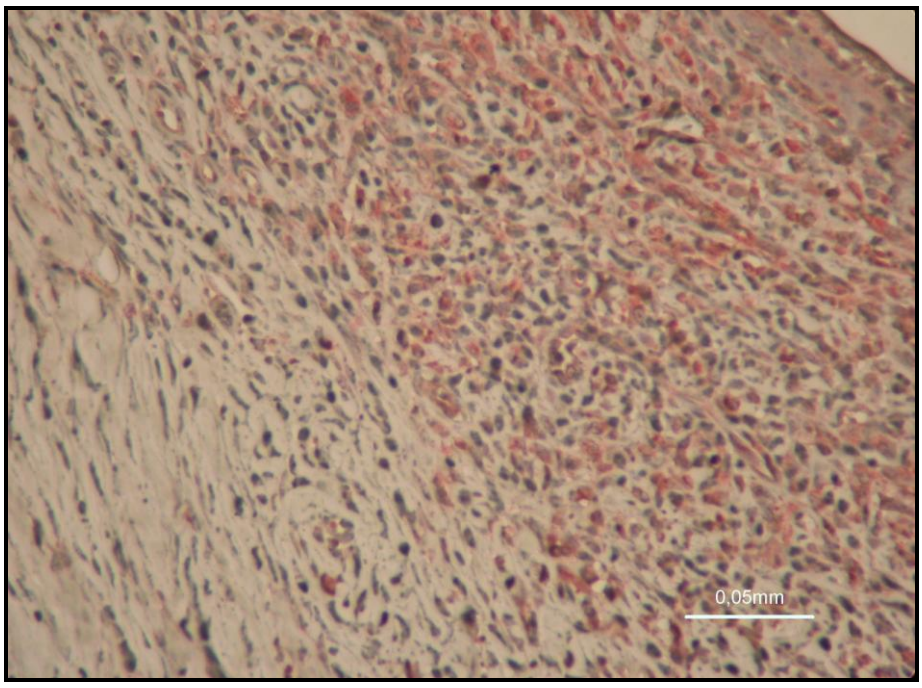
Resim 3.6. Grup A *(K)*'da dişeti iNOS monoklonal antikoru ile boyanan hücreler.



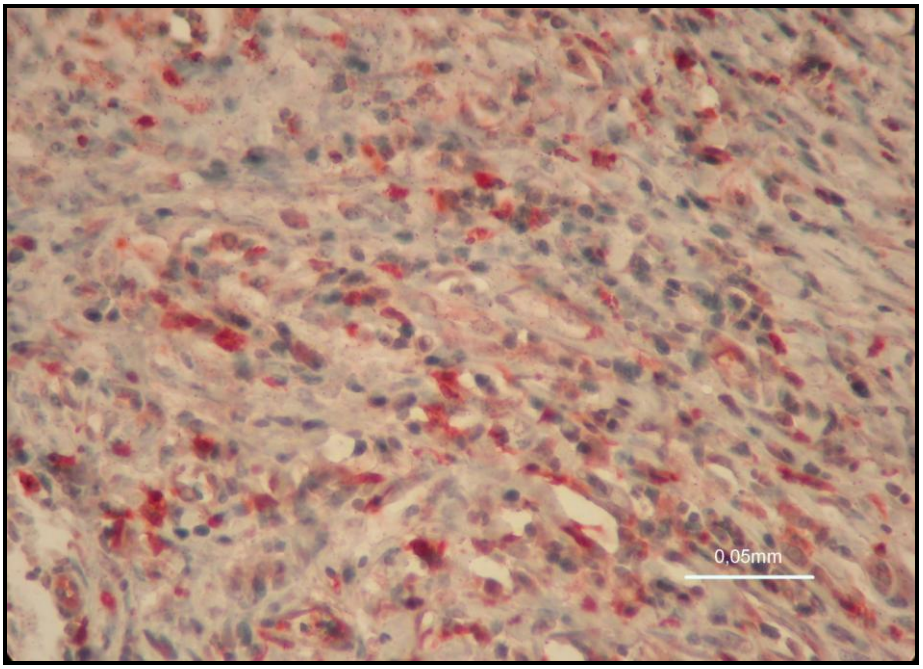
Resim 3.7. Grup B *(Se)*'de dişeti iNOS monoklonal antikoru ile boyanan hücreler.



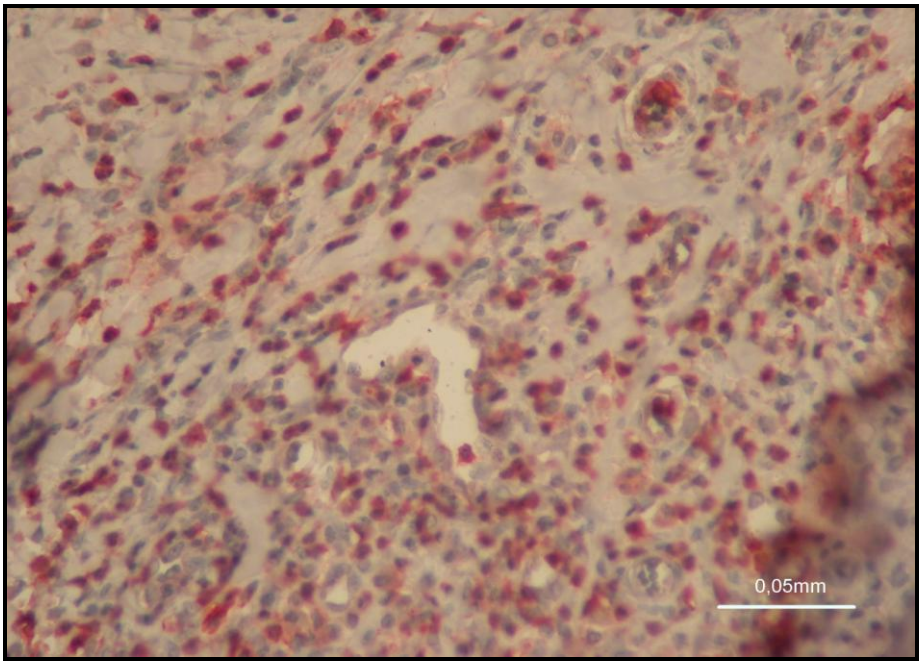
Resim 3.8. Grup C *(αT)*'de dişeti iNOS monoklonal antikoru ile boyanan hücreler.



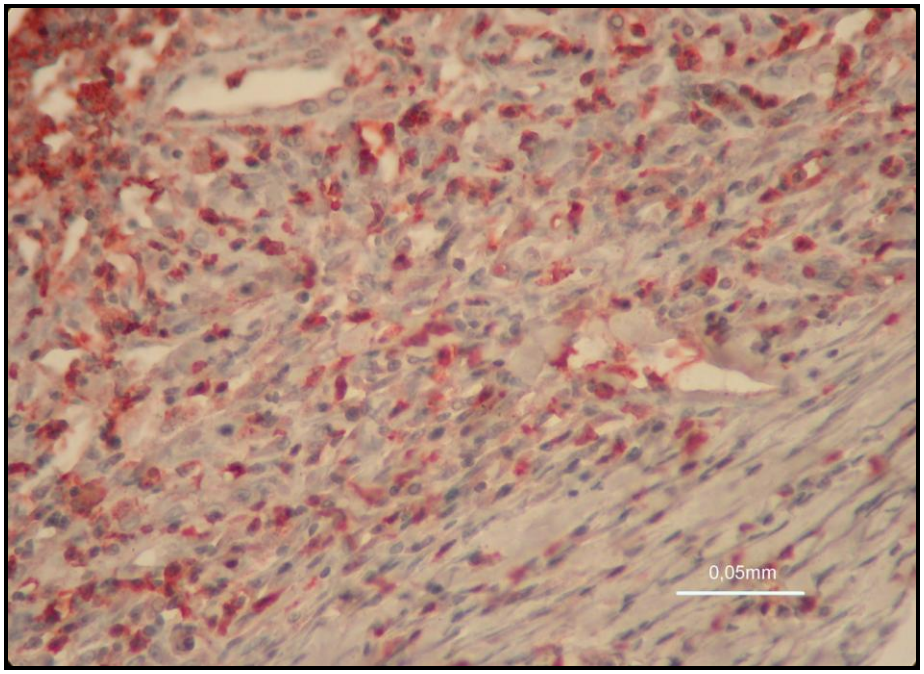
Resim 3.9. Grup D *(Se+αT)*'de dişeti iNOS monoklonal antikoru ile boyanan hücreler.



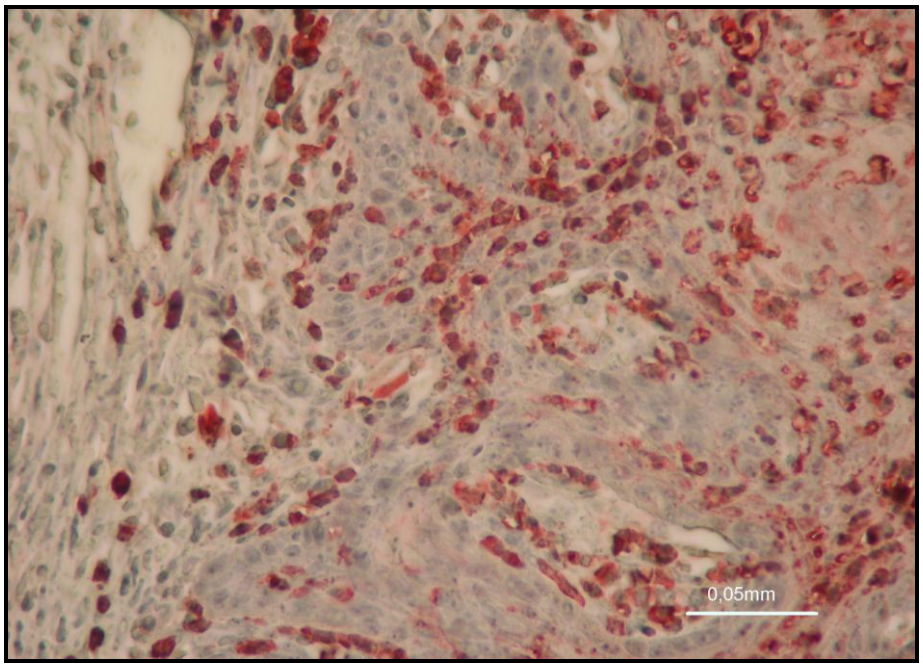
Resim 3.10. Grup A *(K)*'ya ait kesitlerde CD95 monoklonal antikoru ile boyanan hücreler.



Resim 3.11. Grup B *(Se)*'ya ait kesitlerde CD95 monoklonal antikoru ile boyanan hücreler



Resim 3.12. Grup C (αT)'ye ait kesitlerde CD95 monoklonal antikoru ile boyanan hücreler.



Resim 3.13. Grup D *(Se+αT)*'ye ait kesitlerde CD95 monoklonal antikoru ile boyanan hücreler.

4. TARTIŞMA

Antioksidanların enflamatuvar hastalıklarda kullanımı yeni değildir. Son yıllarda yara iyileşmesi (Prabhu ve ark 2002), diyabet (Ayaz ve ark 2002), gastrik ülser (Oh ve ark 2005), karaciğer hasarı (Sodhi ve ark 2008), kanser (Huang ve ark 2009) gibi dejeneratif doku yıkımlarında tedaviye yardımcı olarak antioksidanların kullanımına ilgi artmıştır. Yumuşak dokuda enflamasyona bağlı olarak kollajen yıkımı, reaktif oksijen metabolit düzeyleri ve apoptozis gibi bazı yıkım belirteçlerinin düzeylerinde önemli değişimler olduğu ve kullanılan antioksidanların bu yıkım mekanizması üzerine etkileri olduğu rapor edilmiştir (Zhou ve ark 2009). Literatürde periodontal doku yıkımında değişik antioksidanların kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır (Cai ve ark 2007, Di Paola ve ark 2005, Leitao ve ark 2004, Cutando ve ark 2007a). Ancak, sodyum selenit ve alfa-tokoferolün antienflamatuvar ve antioksidan özelliklerinin deneysel periodontitis üzerine etkileri ile ilgili çalışmalar sınırlıdır (Asman ve ark 1994, Parrish ve ark 1977). Bu araştırmada, sıçanlara sodyum selenit ve alfa-tokoferol tek başına ve kombine olarak verildi ve histometrik, immünohistokimyasal ve serum biyokimyasal parametreleri kullanılarak periodontal dokudaki etkileri incelendi. Sodyum selenit ve alfa-tokoferolün birlikte kullanımının alveoler kemik kaybını azalttığı ve sadece sodyum selenit uygulamasının dişeti iNOS pozitif hücre sayısını önemli oranda baskıladığı saptandı. Ayrıca, CD95 pozitif boyanan hücre sayıları sodyum selenit ve kombine grupları kontrol grubuna göre daha düşüktü, ancak fark istatistiksel olarak önemli değildi. Alfa-tokoferol ve sodyum selenitin serum IL-1β, IL-4 ve IL-6 konsantrasyonlarına etkisinin olmadığı gözlendi. Bilgilerimiz dahilinde bu çalışma deneysel periodontitis oluştuurlmuş sıçanlarda sodyum selenit ve/veya alfa-tokoferol'ün dişeti iNOS, CD95 ekspresyonları ve serum sitokin seviyelerini değerlendiren ilk araştırmadır.

4.1. Deneysel Çalışma Modeli

Deneysel hayvan çalışmalarında sıçanların kullanımı oldukça yaygındır. Sıçanların periodontal dokuları değerlendirildiğinde cep epitelinin keratinizasyonu, kemik yıkımının düzensiz ve sürekli olması, gram negatif bakterilere karşı gelişen

yıkımın hücre ilişkili immün cevap içermemesi ve periodontal hastalığa karşı nispeten daha dirençli olmaları gibi insanlardan farklı özellikleri olduğu gösterilmiştir (Weinberg ve ark 1999). Ancak, sığ gingival sulkus ve birleşim epitelinin diş yüzeyine ataşmanı gibi dentogingival bölge özelliklerinin insanlara benzerlik göstermesi nedeniyle sıçanlar deneysel periodontitis çalışmalarında sıkça tercih edilmektedir (Struillou ve ark 2010).

Hayvanlar üzerinde yürütülen deneysel çalışmalarda dişetinde enflamasyon oluşturmak ve alveoler kemik kaybını elde etmek amacıyla cerrahi işlemle defekt oluşturulması (Higuchi ve ark 1999), bakteriyel oral gavaj (Tani-Ishii ve ark 2003, Polak ve ark 2009), LPS uygulaması (Rogers ve ark 2007a, Rogers ve ark 2007b) ve molar dişlerin subgingival alanına ipek sütur bağlanması (Bain ve ark 2009) gibi yöntemler kullanılmaktadır. Sütur bağlanarak oluşturulan deneysel periodontitis modelinde doku travması ve mikrobiyal birikim hızlı bir yıkımla akut bir cevap oluşturur. Akut enflamasyon zaman içinde kronik enflamasyona dönüşerek daha farklı proenflamatuvar/antenflamatuvar sitokin profili, antioksidan aktivite ve ROT üretimi gösterir (Di Paola ve ark 2005). Böylece deneysel periodontitis oluşturularak zamanla alveoler kemik kaybı elde edilmektedir. Literatürde yedinci günde (Bezerra ve ark 2000), onbirinci günde (Toker ve ark 2009) en yüksek alveoler kemik kaybının elde edildiğini gösteren çalışmalar vardır. Kuhr ve ark. (2004) sıçanların molar dişerine sütur bağlamışlar ve 1., 15., 30. ve 60. günlerde aldıkları kesitlerde morfometrik olarak alveoler kemik düzeyini ölçmüşlerdir. Çalışma sonunda en fazla kemik kaybının ilk 15 günlük süreçte meydana geldiğini 30. ve 60. günlerdeki kaybın hafif bir artış olarak devam ettiğini saptamışlardır. Bu çalışmada sıçanların sol alt birinci molar dişlerine subgingival olarak 3/0 ipek sütur materyali yerleştirilmiş ve bir ay süre ile süturların molar dişlerin etrafında kalması sağlanarak deneysel periodontitis oluşturulmuştur.

4.2. Alveoler Kemik Kaybı

Literatürde sodyum selenit ve alfa-tokoferolün kemik dokusu üzerine etkilerini inceleyen çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Sıçanlarda selenyum eksikliğinin, kemik metabolizmasının bozulması ve osteopeni ile ilişkili olabileceği bulunmuştur (Reyes ve ark 2001). Ebert ve Jakob (2007) insanlarda selenyum

yetmezliği sonucu gelişen Kashin-Beck hastalığının osteoartrotrofiye neden olduğunu rapor etmiştir. Alfa-tokoferol sıçanlarda nikotine bağlı kemik kaybının az olmasını sağlamıştır (Norazlina ve ark 2007). Literatürde, sodyum selenit ve alfa-tokoferolün antioksidan özellikleri ile ROT üretimini baskıladığını (Maehira ve ark 2003) ve antienflamatuvar özellikleri ile kemik yıkımına neden olan proenflamatuvar sitokinleri kodlayan genlerden sorumlu NFκB'nin aktivasyonunu azalttığını gösteren çalışmalar (Ayasolla ve ark 2004) kemik yıkım mekanizması üzerine olası etkilerini açıklayabilir. Ancak, sodyum selenit ve alfa-tokoferolün alveoler kemik düzeyi üzerine etkisini araştıran çalışma sınırlıdır. Parrish ve ark (1977) sıçanlarda oluşturdukları deneysel periodontitis modelinde sekiz hafta boyunca yeterli, düşük ve yüksek dozlardaki E vitamini diyeti uygulamışlardır. Vitamin uygulanan gruplarla kontrol grubu arasında alveoler kemik kaybı yönünden fark bulumamıştır.

Bu araştırmada, daha hassas alveoler kemik düzeyi ölçümü yapabilmek için görüntü analizi (Clemex Vision Lite 3.5) kullanılmış ve veriler μm olarak kaydedilmiştir. Çalışma sonunda kontrol grubunda ölçülen AKK kombine gruba göre daha fazla olduğu tespit edildi. Alfa-tokoferol ve sodyum selenitin tek başına uygulandığı gruplarda AKK miktarı daha düşüktü, ancak istatistiksel olarak farklı değildi. Sodyum selenit ve alfa-tokoferol'ün kombine kullanımının sinerjistik etki oluşturarak önemli oranda alveoler kemik yıkımını engellediği sonucuna varıldı.

4.3. Kollajen Lif Sayısı

Dişeti bağdokusunun temel bileşeni olan kollajen periodontal hastalığın başından itibaren hızlı bir yıkıma uğrar (Schwartz ve ark 1997). Gingivitisin periodontitise dönüşmesiyle periodontal ligamentin kollajen fibrilleri de yıkılır ve genellikle ardından alveoler kemik kaybı görülebilir (Zee ve ark 1997). Literatürde farklı antienflamatuvar ve antioksidanların deri, kemik (Ricciarelli ve ark 1998, Ayaz ve ark 2002, Oh ve ark 2009, Chen ve ark 2010) ve dişeti (Preshaw ve ark 2004, Cai ve ark 2007, Botelho ve ark 2009, Dang La ve ark 2009, Dang La ve ark 2010). Cai ve ark (2007) gibi farklı dokulardaki kollajen yıkımının önlenmesi amacıyla kullanılabileceğine yönelik çalışmalar vardır. Sodyum selenit ve/veya alfa-tokoferol'ün boyun bölgesi, deri, ösefagus kalp dokusundaki kollajen yıkımını azalttığı (Asman ve ark 1994, Azzi ve ark 2000, RaoveVijayakumar 2008, Ayaz ve

ark 2002) rapor edilmiştir. Bu araştırmada sodyum selenit ve/veya alfa-tokoferol'ün dişeti dokusu kollajen miktarı üzerine etkisi incelendi. Sıçanlara 3/0 ipek sütur bağlanarak dört hafta sonunda deneysel periodontitis ve yumuşak dokuda kollajen kaybı oluşturuldu. Sıçan dişeti örneklerindeki kollajen lif sayısı birleşim epitelinin alt kısmında bağdokusundaki 0,1mm^2'lik alan seçilerek ve görüntü analiz sistemi kullanılarak değerlendirildi. Bu araştırmada kontrol grubundaki kollajen kaybı sodyum selenit ve/veya alfa-tokoferol gruplarından daha fazla düzeyde tespit edildi. Özellikle kombine gruptaki kollajen lif sayısı belirgin olarak daha fazla olmasına karşın farklılık önemli bulunmadı. Bu araştırmanın sınırları içerisinde özellikle sodyum selenit ve alfa-tokoferolün birlikte kullanımının dişeti kollajen yıkımını engelleme eğiliminde olduğu düşünülmektedir.

4.4. Serum Sitokin Konsantrasyonları

Periodontal doku yıkımında proenflamatuvar ve antienflamatuvar sitokinler arasındaki dengenin önemi üzerinde durulmaktadır. Periodontal hastalıkta dişetinde IL-1β (Reynold ve ark 1997, Stashenko ve ark 1991) ve IL-6 (Reynold ve ark 1997, Hirose ve ark 2001) seviyeleri artarken, antienflamatuvar bir sitokin olan IL-4 düzeyi azalmaktadır (Ejeil ve ark 2003). Periodontal doku yıkımında artan sitokin düzeyinin seruma geçerek sistemik etkiye sahip olabileceği ileri sürülmektedir (Loos ve ark 2000, Gorska ve ark 2003). Periodontitisli hastalardan elde edilen plazma örneklerinde IL-6 (Loos ve ark 2000), IL-1β (Gorska ve ark 2003) konsantrasyonları sağlıklı bireylere göre yüksek bulunurken IL-4 sıklıkla sağlıklı bireylerde tespit edilmiştir (Gorska ve ark 2003).

Deneysel araştırmalarda proenflamatuvar ve antienflamatuvar sitokinlerin antioksidan ve antienflamatuvar ilaçlarla düzenlenerek doku yıkımının durdurulabileceği rapor edilmiştir (Armutcu ve ark 2007, Jaspers ve ark 2007). Ancak, literatürde sodyum selenit uygulamasının serum sitokin düzeylerine etkisini araştıran az sayıda çalışma vardır (Grundling ve ark 2009). Grundling ve ark (2009) sıçanlarda LPS'le sistemik olarak deneysel endotoksemi oluşturduktan sonra 100 µg/kg tek doz ve sadece bir gün sodyum selenit uygulamışlar ve plazma TNF-α, IL-1β, IL-6 ve IL-10 düzeylerinin değiştirmediğini saptamışlardır (Grundling ve ark 2009). Bu çalışmada sıçanlara IP olarak 0,2mg/kg/gün sodyum selenit ve/veya

40mg/kg alfa-tokoferol uygulanmış ve gruplar arasında serum IL-6, IL-1β, IL-4 sitokin konsantrasyonları kıyaslanmıştır. Grundling ve ark (2009)'na benzer olarak sodyum selenitin serum sitokin düzeyleri üzerine etkisi tespit edilemedi.

Sistemik alfa-tokerol uygulamasının serum proenflamatuvar ve antienflamatuvar sitokinler üzerine olası etkileri ile ilgili birçok çalışma vardır, ancak ortak bir sonuca varılamamıştır (Mol ve ark 1996, Godbout ve ark 2005, Norazlina ve ark 2007). Sigara içen, diyabet ve kontrol gruplarından oluşan insanlara dört hafta boyunca 600 IU E vitamini uygulaması sistemik IL-1β düzeylerini etkilemediği gösterilmiştir (Mol ve ark 1997). Farelerde üç günlük 20 mg/kg alfa-tokoferol uygulamasının ardından intraperitoneal LPS enjeksiyonu yapılarak NFκB aktivasyonu ve beyindeki proenflamatuvar sitokin üretimine bakılmış ve NFκB ilişkili yolakla IL-6 ve IL-1β üretiminin azaldığı gösterilmiştir (Godbout ve ark 2005). Sıçanlarda nikotine bağlı olarak artan serum IL-1 ve IL-6 konsatrasyonunu baskılamak amacıyla iki ay süresince 60mg/kg/gün ağızdan alfa-tokoferol verilmiş, ancak herhangi bir etkisi tespit edilememiştir (Norazlina ve ark 2007). Bu araştırmada alfa-toferol'ün tek başına veya sodyum selenit'le kombine kullanımı serum IL-1β, IL-6 ve IL-4 sitokin konsantrasyonlarını değiştirmemiştir. Sodyum selenit ve/veya alfa-tokoferolün dişeti sitokin düzeyleri üzerine etkisi değerlendirilmediğinden, sitokinlerin seruma olası geçişi ile ilgili bir sonuca ulaşılamamıştır. Ayrıca daha uzun süre ve farklı doz uygulamalarının sonucu değiştirebileceği düşünülmektedir.

4.5. iNOS Pozitif Boyanan Hücreler

İndüklenebilir nitrik oksit sentaz, enflamatuvar doku yıkımında özellikle bakteriyel LPS'ler ile uyarılmış olan nötrofil (Tsukahara 2001) ve makrofajlar (Houde ve ark 2006) tarafından eksprese edilen, L-arjininden NO sentezleyen bir enzimdir (Ikeda ve ark 1998). Periodontitiste doku yıkımının şiddetine paralel olarak iNOS düzeyi artış göstermektedir (Lappin ve ark 2000, Hirose ve ark 2001, Lohinai ve ark 2001). Periodontontal doku yıkımında iNOS ekspresyonunun baskılayan "üzüm çekirdeği proanthocyanidinleri" (Houde ve ark 2006), "L-arginin metil ester" (Leitão ve ark 2005), gibi ajanlar, "etanercept" gibi TNF-α antagonisti (Di Paola ve

ark 2007) ve baicalin (Cai ve ark 2007) gibi maddeler kullanılarak daha az yıkımın olması sağlanmıştır.

Literatürde antienflamatuvar özellikte olan sodyum selenitin iNOS makrofaj hücreleri, pankreas (Prabhu ve ark 2002, Yun ve ark 2007, Zeng ve ark 2009) gibi farklı dokulardaki iNOS ekspresyonunu ve enflamasyonu baskıladığı gösterilmiştir. Farelerde deneysel diyabet modeli oluşturulmuş ve sodyum selenit uygulamasıyla pankreas dokusunda sitokin aracılıklı artan iNOS mRNA ekspresyonunun baskılandığı saptanmıştır (Zeng ve ark 2009). Lipopolisakkaritle uyarılmış edilmiş RAW 264.7 hücrelerinde yapılan çalışmalarda selenyumun iNOS'u aktive eden NFκB'yi baskılayarak doku yıkımını önleyici etkisi ortaya konulmuştur (Prabhu ve ark 2002, Yun ve ark 2007). Bilgilerimiz dahilinde dişeti dokusunda sodyum selenit'in iNOS ekspresyonuna etkisi ile ilgili bir araştırmaya rastlanmamıştır. Bu araştırma sonucunda sodyum selenit uygulanan gruptaki dişeti iNOS pozitif hücre sayısı kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük düzeyde bulundu. Elde edilen bu veri, sodyum selenit'in bakteriyel endotoksin ile ilişkili olarak dişeti dokusunda artan iNOS pozitif hücre sayısını baskıladığını ve bu yolla doku yıkımını engelleyebileceğini gösterebilir.

Alfa tokoferol'ün beyin, mide mukozası gibi periodontal doku dışında diğer yapılardaki iNOS pozitif hücre sayısını baskılayıcı yönde etkisi olduğu rapor edilmiştir (Ayasolla ve ark 2004, Khanduja ve ark 2004, Oh ve ark 2005). Mide mukozasının *H. pylori* enfeksiyonu, hipoklorik asit gibi bazı etkilere karşı korumak amacıyla alfa-tokoferol uygulamasının HSP27 düzeyini arttırarak iNOS ekspresyonunu baskıladığı saptanmıştır (Oh ve ark 2005). Alfa-tokoferolün, astrosit ve mikroglia hücrelerinde NFκB'nin baskılanmasıyla sitokinle aktive olmuş iNOS ekspresyonunu azalttığı tespit edilmiştir (Ayasolla ve ark 2004). Khanduja ve ark (2004) sıçanlara farklı dozlarda E vitamini uygulayarak akciğerdeki alveol makrofajlarında LPS'ye bağlı artan iNOS ekspresyonuna etkisini değerlendirmişler ve daha yüksek dozlarda daha fazla baskılanma elde edilmediğini rapor etmişlerdir. Bu araştırmada 40mg/kg alfa-tokoferol uygulanmış ve dişeti dokusu iNOS pozitif hücre sayısı kontrollere göre daha düşük düzeyde tespit edilmiştir, ancak istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Özellikle sodyum selenit ve alfa-tokoferol'ün kombine uygulanmasının da dişeti iNOS pozitif hücre sayısını baskılama eğiliminde olduğu

saptanmıştır. Buna bağlı azalan enflamasyon sonucunda dişeti kollejen lif sayısı artarken ve AKK'nin azalma eğiliminde olduğu düşünülmektedir. Ancak, sodyum selenit ve/veya alfa-tokoferol'ün dişeti iNOS pozitif hücre sayısı üzerine etkisinin değerlendirildiği herhangi bir çalışmaya rastlanmadığından elde edilen sonuçlar kıyaslanamamıştır.

4.6. CD95 Pozitif Boyanan Hücreler

Periodontitis alveoler kemik kaybıyla karakterize bir hastalıktır ve yıkım mekanizmasında programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanan "apoptozis"teki değişimin önemi üzerinde durulmaktadır (Preshaw ve ark 1999, Jarnbring ve ark 2002). Apoptozisin dışsal yolaklarında en önemli reseptör olarak görev alan CD95'in özellikle periodontal hastalık patogenezinde etkili olabileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Gamonal ve ark 2001, Brozovic ve ark 2006).

Antienflamatuvar ve antioksidan özellikteki sodyum selenit'in apoptozis mekanizması üzerine etkisi olabileceği, farklı dokularda ve değişik dozlarda patolojik değişimleri önleyebileceği saptanmıştır (Yeo ve Kang 2007, Li ve ark 2004, Shen ve ark 2004). Travmaya bağlı yaralanma gibi apoptotik hücre ölümünün arttığı durumlarda sodyum selenit uygulamalarının apoptozisi azalttığı (Yeo ve Kang 2007), karaciğer fibrozisi (Shen ve ark 2004) ve kanser oluşumu (Fang ve ark 2010) gibi apoptozisin baskılandığı patolojilerde sodyum selenit uygulamalarının apoptozisi arttırarak bozulan mekanizmayı iyileştirmeye yönelik etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir. Yeo ve Kang (2007) deney hayvanlarında travmatik beyin yaralanması modeli oluşturarak apoptotik hücre ölümü gerçekleştirmişler ve sodyum selenit uygulamasının ROT aracılıklı stokrom-c salınımını, kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivasyonlarını baskıladığını ve fonksiyonel nöronların yaşam sürelerini uzattığını rapor etmişlerdir. Ancak, Kiang ve ark (2008)'nın yaptığı bir çalışmada insan T lenfositlerinden elde edilen hücre kültüründe iNOS'un baskılanması kaspaz-3 aktivitesini azaltarak apoptozisin daha az olmasını sağlarken CD95 ekspresyonunu etkilememiştir. Bu çalışmada dört haftalık süre sonunda sodyum selenit, alfa-tokoferol ve bunların kombine kullanımlarının dişeti dokusu CD95 pozitif hücre sayıları üzerine etkisine bakıldı. Kontrol grubundaki CD95 düzeyi sodyum selenit, alfa-tokoferol ve bunların kombine kullanıldığı gruplardan daha fazla bulundu, ancak

fark istatistiksel olarak önemli değildi. Bu araştırmada sodyum selenit'in iNOS ekspresyonunu baskılayarak CD95 üzerinde baskılayıcı etki gösterdiği düşünülmektedir. Esaki ve ark. (2000) insan aterom plaklarının bol miktarda iNOS eksprese ettiğini ve bu yolla Fas/FasL ilişkili apoptosisi arttırdığı, sıçanlarda deneysel otoimmün uveit modelinde NO'in CD95 ilişkili apoptosis yolağı ile T hücrelerinin apoptozisine neden olduğunu (Liversidge ve ark 2002) bulan çalışmalar sonuçlarımızı destekler niteliktedir. Ancak, sodyum selenitin ve alfa-tokoferolün dişeti dokusunda apoptotik hücre ölümü üzerine etkisini araştıran çalışma bulunamadığından elde edilen sonuçlar kıyaslanamamıştır.

Literatürde alfa-tokoferolün apoptotik hücre ölümünü baskılayarak enflamatuvar değişiklikleri önlediği saptanmıştır (Li ve ark 2004, Ramanathan ve ark 2006). Hiperlipidemik tavşanlara altı ay boyunca alfa-tokoferol verilmesi damar duvarında makrofaj apoptozisini azaltmıştır (Li ve ark 2004). Ramanathan ve ark (2006) sıçanlarda arsenikle oluşturulan toksisitede alfa-tokoferol uygulamış ve karaciğer ve böbrek dokularında apoptozis oranlarının azaldığını rapor etmiştir. İnsan immün yetmezlik virüsü bulunan hastalardan elde edilen T lenfosit kültürlerine E vitamini eklenmesi CD95L ekspresyonunu baskılayarak CD95 ilişkili apoptozisle ortadan kaldırılması engellenmiştir (Weber ve ark 2003). Bu araştırmanın sınırları içinde tek başına sodyum selenit uygulanan ve sodyum selenit ve alfa-tokoferolün birlikte kullanıldığı kombine tedavi gruplarında CD95 pozitif boyanan hücre düzeyinin daha fazla baskılandığı, ancak elde edilen sonucun istatistiksel olarak önemli olmadığı bulunmuştur. Araştırma gruplarında dişeti iNOS ekspresyonundaki baskılanmasının fazla olmasının CD95'in baskılanmasıyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, sodyum selenit ve alfa-tokoferol'ün uygulama dozları, değerlendirilen dokuda pozitif boyanan hücrelerin çeşitliliği ve değerlendirilemeyen örnekler nedeniyle gruplardaki örnek sayılarının az olması bu araştırmanın limitasyonları içerisinde düşünülmektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

1) Sodyum selenit ve alfa-tokoferolün kombine kullanımının AKK'yi kontrollere kıyasla önemli ölçüde baskıladığı saptandı. Bu fark sodyum selenit ve alfa-tokoferol'ün tek başına kullanıldığı gruplarda önemli değildi.

2) Sodyum selenit ve alfa-tokoferol'ün birlikte kullanıldığı gruptaki dişeti dokusu kollajen lif sayısı kontrollere göre daha fazla olma eğilimindeydi, ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

3) Dört hafta süresince 0,2mg/kg/gün sodyum selenit uygulamasının, enflamasyon ve doku yıkımının önemli belirteçlerinden birisi ve nitrosatif stresin göstergesi olan iNOS düzeylerinin düşürülmesinde etkili olduğu tespit edildi. Diğer gruplarda özellikle de kombine gruptaki dişeti iNOS pozitif hücre sayısı kontrollere göre daha düşük olma eğilimi istatistiksel olarak önemsizdi.

4) Çalışma gruplarından özellikle sodyum selenit ve kombine gruplardaki dişeti CD95 pozitif hücre sayısı kontrol grubuna göre daha düşük olma eğilimindeydi, ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

5) Bu çalışmanın sınırları içinde antioksidan ve antienflamatuvar uygulamalarının serum sitokin seviyeleri üzerine etkisi bulunmadı.

Bu araştırmada endotoksinlerin ve dokuda artan sitokin düzeylerinin enflamasyon ve doku yıkımda önemli rolü olduğu düşünülen iNOS düzeyini ve buna bağlı olarak apoptotik hücre ölümünü arttırdığı ve bunun sonucunda gelişen kaybın sistemik olarak antioksidan ve antienflamatuvar özellikteki sodyum selenit ve/veya alfa-tokoferol uygulanarak baskılanabileceği hipotezi değerlendirilmiştir. Bu araştırmanın sınırları içerisinde özellikle sodyum selenit'in iNOS pozitif hücre sayısını azalttığı ve dişeti CD95 ekspresyonunu baskılama eğiliminde olduğu sonucu elde edildi. Ancak, alfa-tokoferol'ün tek başına uygulanmasının doku yıkım belirteçleri üzerine olan etkisi sınırlıydı. Sodyum selenit ve alfa-tokoferol'ün kombine kullanımının AKK'yı kontrollere göre önemli ölçüde azalttığı saptanmıştır. Bu sonucun baskılanan dişeti iNOS ve CD95 ekspresyonları ve artan kollajen lif

sayısı ile ilşkili olabileceği düşünülmektedir. Diğer taraftan, bu araştırmada dişeti dokusu sitokin düzeylerine bakılmadığından sodyum selenit ve/veya alfa-tokoferol uygulamalarının dişeti dokusundaki olası etkileri gösterilememiştir. Gelecekte sodyum selenit ve alfa-tokoferol'ün doku ve serum sitokin düzeylerine etkisinin kıyaslanmasına yönelik çalışmalar yapılabilir. Periodontal doku yıkımının önlenmesinde sodyum selenit ve/veya alfa-tokoferol uygulamalarının dişeti dokusu sitokin, iNOS ve CD95 ekspresyon düzeylerine etkisinin farklı dozda, sürelerde ve çalışma gruplarında değerlendirileceği çalışmalarla desteklenmelidir.

6. ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Deneysel Periodontitisli Sıçanlarda Alfa-Tokoferol ve Sodyum Selenit Uygulamasının Serum Sitokin Düzeyleri ve Dişeti iNOS ve CD95 Ekspresyon Düzeylerine Etkileri

"Nurgül Baş"

Periodontoloji Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2010

Bu çalışmanın amacı sıçanlarda ligatürle oluşturulan deneysel periodontitiste sodyum selenit ve/veya alfa-tokoferol uygulamalarının alveoler kemik kaybı, dişeti kollajen lif sayısı, uyarılabilir nitrik oksit sentaz (iNOS)+ ve CD95+ hücre sayıları ve serum sitokin konsantrasyonları üzerine olan etkilerini incelemektir.

Dört haftalık çalışmada, sıçanların sol alt molar dişinin dişeti kenarına 3/0 ipek sütur bağlandı. Daha sonra, her grupta on adet olacak şekilde toplam kırk Sprague Dawley sıçan dört gruba ayrıldı: Grup A (*K*): kontrol grubu, intraperitoniyal (IP) serum fizyolojik enjeksiyonu, Grup B (Se): sodyum selenit grubu, (0.2 mg/kg/gün, IP), Grup C (αT): alfa-tokoferol grubu (40 mg/kg/gün, IP), Grup D ($Se + \alpha T$): kombine grup, alfa-tokoferol ve sodyum selenit'in kombine kullanıldığı grup (40 mg/kg/gün ve 0.2 mg/kg/gün IP). Dokular histometrik ve immünohistokimyasal inceleme için %10'luk formaldehit solüsyonu ile fikse edildi. Alveoler kemik kaybı (AKK) Clemex Vision Lite 3.5 görüntü analiz yöntemiyle değerlendirildi. Birleşim epitelinin altındaki bağdokusunda iNOS, CD95 pozitif hücre ve kollajen lif sayıları görüntü analiz sistemi kullanılarak sayıldı. Serum interlökin (IL)-1β, IL-6 ve IL-4 konsantrasyonları ELISA kitleriyle ölçüldü. İstatistiksel analiz için Kruskal-Wallis Testi ve Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi yapıldı

Çalışmanın sonunda $Se+\alpha T$'nin birlikte kullanıldığı grup AKK'yı kontrol grubuna göre önemli derecede baskıladı ($p<0,05$). Serum sitokin konsantrasyonları açısından gruplar arasında fark yoktu ($p>0,05$). Grup D'deki kollajen lif miktarı kontrol grubundan daha fazlaydı, ancak fark önemli değildi ($p>0,05$). Grup B'deki iNOS+ sayısı Grup A'dakinden düşüktü ($p<0,05$). Grup C'deki histometrik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal parameterelerin hiçbiri Grup A'ya göre önemli bir fark göstremedi ($p>0,05$). Kombine olarak $Se+\alpha T$ uygulanması iNOS+ ve CD95+ hücre sayısını kontrollere kıyasla azalttı, ancak fark anlamlı bulunmadı ($p>0,05$).

Sıçan modelinde sodyum selenitin iNOS'a bağlı dişeti enflamasyonunu baskıladığı sonucuna varıldı. Bu çalışmanın sınırları içinde sodyum selenit ve/veya alfa-tokoferol uygulamasının periodontal doku yıkımının engellenmesinde faydalı olabileceği öne sürülebilir.

Anahtar Sözcükler: alfa-tokoferol; CD95; deneysel periodontitis; iNOS; sodyum selenit.

7. SUMMARY

The Effects of Alpha-Tocopherol and Sodium Selenite on Serum Cytokine Levels and, iNOS and CD95 Expression in Gingival Tissues of Rats with Experimental Periodontitis

The aim of this study was to evaluate the effects of sodium selenite and/or alpha-tocopherol administration on alveolar bone loss, number of gingival collagen fibers, inducible nitric oxide synthase (iNOS)+ and CD95+ cells and serum cytokine concentrations in rats with ligature induced periodontitis.

In this four-week study, 3/0 silk sutures were placed at the gingival margin of the lower right first molars in a mandibular quadrant. Forty male Sprague Dawley rats were then divided into four groups of ten rats each: Group A (*C*): a control group, saline intraperitoneal injection (IP), Group B (*Se*): sodium selenite group (0.2 mg/kg/day, IP), Group C (*αT*): alpha-tocopherol group (40 mg/kg/day IP), and Group D (*Se*+*αT*): combined group, alpha-tocopherol used in combination with sodium selenite (0.2 mg/kg/day and 40 mg/kg/day, IP). The tissues were fixed using neutral buffered 10% formaldehyde solution for histometrical and immunohistochemical examination. Alveolar bone loss (ABL) (μm) was measured by Clemex Vision Lite 3.5 vision analysis system. The number of iNOS, CD95 positive cells and collagen fibers in subepithelial connective tissue beneath the sulcular epithelium were counted by using the same image analysis system. The concentrations of serum interleukin (IL)-1β, IL-6 and IL-4 levels were measured by using ELISA kits. Kruskal-Wallis test and Bonferroni adjusted Mann Whitney U tests were used for the statistical analysis.

At the end of the study, the combination of *Se* and *αT* suppressed ABL compared to saline group ($p<0,05$). There was no statistically significant differences in serum cytokine concentrations among the study groups ($p>0,05$). Higher levels of collagen fiber counts were found in Group D compared to controls, but differences were not significant ($p>0,05$). The number of iNOS+ cells in Group B was at lower levels than Group A ($p<0,05$). Histometrical, immunohistochemical and biochemical parameters in Group C were not significantly different than Group A ($p>0,05$). The combination of *Se* and *αT* administration decreased the number of iNOS+ and CD95+ cells compared to the controls, but there was no significant difference ($p>0,05$).

We concluded that sodium selenite suppressed iNOS-induced gingival inflammation in rat models. Within the limits of this study, it can be suggested that sodium selenite and/or alpha-tocopherol administration may be useful to prevent periodontal tissue destruction.

Key words: alpha-tocopherol; CD95; experimental periodontitis; iNOS; sodium selenite.

8. KAYNAKLAR

1. Academy Report. Modulation of the host response in periodontal therapy. J Periodontol, 2002;73: 460-70.

2. Academy Report. Epidemiology of periodontal diseases. J Periodontol, 2005;76: 1406-19.

3. Acworth IN; McCabe DR, Maher TJ. The analysis of free radicals, their reaction products, and antioxidants, In Baskin SI, Salem H, editors. Oxidants, Antioxidants, And Free Radicals Maryland. Taylor&Francis, 2000: 23-77.

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

5. Akalın 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 Periodontol, 2005;32: 238-43.

6. Akalın FA, Baltacıoğlu E, Alver A, Karabulut E. Total antioxidant capacity and superoxide dismutase activity levels in serum and gingival crevicular fluid in pregnant women with chronic periodontitis. J Periodontol, 2009;80: 457-67.

7. Aksoy M. Beslenme Biyokimyası Ankara. Hatiboğlu Yayınevi 2000: 541-46.

8. Aldred S, Sozzi T, Mudway I, Grant MM, Neubert H, Kelly FJ, Griffiths HR. Alpha-tocopherol supplementation elevates plasma apoplipoprotein A1 isoforms in normal healty subjects. Proteomics. 2006;6: 1695-703.

9. Amano A. Molecular interaction of Porphyromonas gingivalis with host cells: implication for the microbial pathogenesis of periodontal disease. J Periodontol, 2003;74: 90-6.

10. Armutcu F, Çabuk 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. Pestic Biochemand Physiol, 2007;88: 209–12.

11. Artese L, Piattelli A, Cardoso LAG, Ferrari DS, Onuma T, Piccirilli M, Faveri M, Perrotti V, Simon M, Shibli JA. Immunoexpression of angiogenesis, nitric oxide synthase, and proliferation markers in gingival samples of patients with aggressive and chronic periodontitis. J Periodontol, 2010;81: 718-26.

12. Asman B, Wijkander P, Hjerpe A. Reduction of collagen degradation in experimental granulation tissue by vitamin E and selenium. J Clin Periodintol, 1994:21: 45-7.

13. Assuma R, Oates T, Cochran D, Amar S, Graves DT. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. J Immunol, 1998;160: 403-9.

14. Aurer A, Aleksic J, Kardum M, Aurer J, Culo F. Nitric oxide synthesis is decreased in periodontitis. J Clin Periodontol, 2001;28: 565-8.

15. Ayasolla K, Khan M, Singh AK, Singh I. Inflammatory mediator and β-amyloid (25–35)-induced ceramide generation and iNOS expression are inhibited by vitamin E. Free Radical Biology & Medicine, 2004;37: 325-38.

16. Ayaz M, Can B, Ozdemir S, Turan B. Protective effect of selenium treatment on diabetes-induced myocardial structural alterations. Biol Trace Elem Res, 2002;89: 215-26.

17. Ayub K, Serracino-Inglott F, Williamson RCN, Mathie RT. Expression of inducible nitric oxide synthase contributes to the development of pancreatitis following pancreatic ischemia and reperfusion. Br J Surgery, 2001;88: 1189-93.

18. Azzi A, Breyer I, Feher M, Pastori M, Ricciarelli R, Spycher S, Staffieri M, Stocker A, Zimmer S, Zingg JM. Specific cellular responses to α-tocopherol J.Nutr. 2000;130:1649–52.

19. Azzi A, Stocker A. Vitamin E: non-antioxidant roles. Prog Lipid Res, 2000;39: 231-55.

20. Bain JL, Lester SR, Henry WD, Bishop CM, Turnage AA, Naftel JP, Johnson RB. Comparative gender differences in local and systemic concentrations of pro-inflammatory cytokines in rats with experimental periodontitis. J Periodont Res, 2009;44: 133–40.

21. Baker PJ, Dixon M, Evans RT, Dufour L, Johnson E, Roopenian DC. CD4+ T cells and the proinflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-6 contribute to alveolar bone loss in mice. Infect Immun, 1999;67: 2804–9.

22. Baltacıoğlu E, Akalın FA, Alver A, Balaban F, Ünsal M, Karabulut E. Total antioxidant capacity and superoxide dismutase activity levels in serum and gingival crevicular fluid in post-menopausal women with chronic periodontitis. J Clin Periodontol, 2006;33: 385-92.

23. Banks MA. Vitamin E polyunsaturated fats: antioxidants and pro-oxidant relationship. In Baskin SI, Salem H, editors. Oxidants, Antioxidants, and Free Radicals Maryland. Taylor&Francis. 2001: 95-121.

24. Bantel H, Beikler T, Flemmig TF, Osthoff KS. Caspase activation is involved in chronic periodontitis. FEBS Letters, 2005;579: 5559–64.

25. Barker T, Leonard SW, Travick RH, Martins TB, Kjeldsberg CR, Hill HR, Traber MG. Modulation of inflammation by vitamin E and C supplementation prior to anterior cruciate ligament surgery. Free radical Biology & Medicine, 2009;46: 599-606.

26. Barnhart BC, Alappat EC, Peter ME. The CD95 TypeI/Type II model. Seminars in Immunology, 2003;15: 185–93.

27. Batista AC, Silva TA, Chun JH, Lara VS. Nitric oxide synthesis and severity of human periodontal disease. Oral Dis, 2002;8: 254–60.

28. Batten P, Yacoub MH, Rose ML. Effect of human cytokines (IFN-γ, TNF-α, IL-1β, IL-4) on porcine endothelial cells: induction of MHC and adhesion molecules and functional significance of these changes. Immunology, 1996;87: 127-33.

29. Bernimoulin JP. Recent concepts in plaque formation. J Clin Periodontol, 2003;30: 7-9.

30. Bezerra MM, De Lima V, Alencar VBM, Vieira IB, Brito GAC, Ribeiro RA, Rocha FAC. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. J Periodontol, 2000;71: 1009-14.

31. Bhagavan NV. Medical Biochemistry. Fourth Edition. Canada. Harcourt Academic Pres. 2001: 912-13.

32. Bochner BBS, Luscinskas FW, Gimbrone MA, Newman W, Sterbinsky SA, Derse-Anthony CP, Klunk D, Schleimer RP. Adhesion of human basophils, eosinophils, and neutrophils to interleukin 1-activated human vascular endothelial cells: contributions of endothelial cell adhesion molecules. J Exp Med, 1991;173: 1553-56.

33. Boosalis MG. The role of selenium in chronic disease. Nutr Clin Pract, 2008;23: 152-60.

34. Botelho MA, Martins JG, Ruela RS, Rachid I, Santos JA, Soares JB, França MC, Montenegro D, Ruela WS, Barros LP, Queiroz DB, Araujo RS, Sampio FC. Protective effect of locally applied carvacrol gel on ligature-induced periodontitis in rats: a tapping mode AFM study. Phytother Res, 2009;23: 1439–48.

35. Brock GR, Butterworth CJ, Matthews JB, Chapple ILC. Local and systemic total antioxidant capacity in periodontitis and health. J Clin Periodontol, 2004;31: 515-21.

36. Brozovic S, Sahoo R, Barve S, Shiba H, Uriarte S, Blumberg RS, Kinane DF. Porphyromonas gingivalis enhances FasL expression via up-regulation of NFκB-mediated gene transcription and induces apoptotic cell death in human gingival epithelial cells. Microbiology, 2006;152: 797–806.

37. Bruce-Keller AJ. Death domain signaling and its role in the central nervous system, In Mattson MP, Estus S, Rangnekar V, editors. Programmed Cell Death Volume 1. Cellular and Molecular Mechanisms. USA.2001: 39-58

38. Buhlin K, Hultin M, Norderyd O, Persson L, Pockley AG, Rabe P, Klinge B, Gustafsson A. Risk factors for atherosclerosis in cases with severe periodontitis. J Clin Periodontol, 2009;36: 541–49.

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

40. Cai X, Li C, Du G, Cao Z. Protective effects of baicalin on ligature-induced periodontitis in rats. J Periodont Res, 2008;43: 14-21.

41. Capuron L, Moranis A, Combe N, Cousson-Gelie F, Fuchs D, Smedt-Peyrusse V, Barberger-Gateau P, Laye S. Vitamin E status and quality of life in elderly: influence of inflammatory processes. Br J Nutr, 2009;102: 1390-94.

42. Chaney SG. Principles of nutrition II: micronutriens In Devlin TM, editors. Textbook of Biochemistry With Clinical Correlations. Fifth edition. USA. A Jhon Wiley & Sons, Inc. Publication. 2002: 1138-64.

43. Chaney SG. Principles of nutrition II: micronutriens In Devlin TM, editors. Textbook of Biochemistry With Clinical Correlations. Sixth Edition. USA. A Jhon Wiley & Sons, Inc. Publication.2006: 1092-119.

44. Champe PC, Harvey RA. Lippicott's Illustrated review serisinden Biyokimya. İkinci baskı. İstanbul. Nobel tıp Kitabevleri Ltd. Şti. 1997: 340-341.

45. Chapple ILC. Role of free radicals and antioxidants in the pathogenesis of the inflammatory periodontal diseases. J Clin Pathol: Mol Pathol, 1996;49: 247-55.

46. Chapple ILC. Oxidative stres, nutrition and neutrogenomics in periodontal health and disease. Int J Dent Hygiene, 2006;4: 15-21.

47. Chapple ILC, Brock GR, Milward MR, Ling N, Matthews JB. Compromised GCF total antioxidant capacity in periodontitis: cause or effect? J Clin Periodontol, 2007;34: 103-10.

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

49. Chen WP, Tang JL, Bao JP, Hu PF, Yu C, Shi ZL, Wu LD. Effects of diallyl sulphide in chondrocyte and cartilage in experimental osteoarthritis in rabbit. Phytother.Res, 2010; (www.interscience.wiley.com) DOI:10.1002/ptr.3267.

50. Cherukuri DP, Nelson MA. Role of reactive oxygen species (ROS) and JNKs in selenite-induced apoptosis in HepG2 cells. Cancer Biol Ther, 2008;7: 697-98.

51. Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. Free Radical Biology & Medicine, 2010;48: 749–62.

52. Clancy RM, Amin AR, Abramson SB. The role of nitric oxide in inflammation and immunity. Arthritis&Rheumatism, 1998;41: 1141-51.

53. Clemens MG. Nitric oxide in liver injury. Hepatology 1999

54. Cochran DL. Inflamation and bone loss in periodontal disease. J Periodontol, 2008;79: 1569-76.

55. Conner EM, Brand SJ, Davis JM, Kang DY, Grisham BM. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease: toxins, mediators, and modulators of gene expression. J Crohn Colitis, 1996;2: 133-47.

56. Correia PN, Carpenter GH, Paterson KL, Proctor GB. Inducible nitric oxide synthase increases secretion from inflamed salivary glands. Rheumatology, 2010;49: 48–56.

57. 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: 1121-9.

58. Cross RK, Wilson KT. Nitric oxide in inflamatory bowel disease. Inflammatory Bowel Diseases, 2003;9: 179-89.

59. Crowley LV. An Introduction to Human Disease: Pathology and Pathophysiolgy Correlations. Sixth Edition. Canada. Jones and Bartlet Publishers. 2004: 39-40.

60. Cutando A, Arana C, Gomez-Moreno G, Escames G, Lopez A, Ferrera MJ, Reiter RJ, Acuna-Castroviejo D. Local application of melatonin into alveolar sockets of beagle dogs reduces tooth removal-induced oxidative stress. J Periodontol, 2007a;78: 576-83.

61. Cutando A, Gomez-Moreno G, Arana C, Castroviejo DA, Reiter RJ. Melatonin: potential functions in the oral cavity. J Periodontol, 2007b;78: 1094-1102.

62. Czapski GA, Cakala M, Chalimoniuk M, Gajkowska B, Strosznajder JB. Role of nitric oxide in the brain during lipopolysaccharide-evoked systemic inflammation. Journal of Neurosci Res, 2007;85: 1694–1703.

63. Çanakçı CF, Tatar A, Çanakçı V, Çiçek Y, Öztaş S, Orbak R. New evidence of premature oxidative DNA damage: mitochondrial DNA deletion in gingival tisue of patients with periodontitis. J Periodontol, 2006;77: 1894-1900.

64. Çetin M, Deniz G, Polat Ü, Yalçın A. Broylerlerde inorganik ve organik selenyum ilavesinin biyokimyasal kan parametreleri üzerine etkisi. Uludag Univ. J Fac Vet Med, 2002;21: 59-63.

65. 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.

66. Dang La V, Bergeron C, Gafner S, Grenier D. Grape seed extract suppresses lipopolysaccharide-induced matrix metalloproteinase (MMP) secretion by macrophages and inhibits human MMP-1 and -9 activities. J Periodontol, 2009;80: 1875-82.

67. Dang La V, Lazzarin F, Ricci D, Fraternale D, Genovese S, Epifano F, Grenier D. Active principles of grindelia robusta exert antiinflammatory properties in a macrophage model. Phytother Res, 2010;24: 1687–92

68. Deas DE, Mackey SA, McDonnel HT. Systemic disease and periodontitis: :manifestations of neutrophil dysfunction Periodontol 2000, 2003;82-104.

69. Denisov ET, Afanasev IB. Oxidation and Antioxidants in Organic Chemistry and Biology. New York. Taylor&Francis Group. 2005: 701-901.

70. De Nardin E. The Role of inflammatory and immunological mediators in periodontitis and cardiovascular disease. Ann Periodontol, 2001;6: 30-40.

71. Desta T, Graves DT. Fibroblast apoptosis induced by Porphyromonas gingivalis is stimulated by a gingipain and caspase-independent pathway that involves apoptosis-inducing factor. Cell Microbiol, 2007;9: 2667-75.

72. Devaraj S, Leonard S, Traber MG, Jialal I. Gamma-tocopherol supplementation alone and in combination with alpha-tocopherol alters biomarkers of oxidative stres and inflammation in subjects with metabolic syndrome. Free Radical Biology & Medicine, 2008;44: 1203–8.

73. Ding M, Potter JJ, Liu X, Torbenson MS, Mezey E. Selenium supplementation decreases hepatic fibrosis in mice after chronic carbon tetrachloride administration. Biol Trace ElemRes, 2010;133: 83–97.

74. Di Paola R, Mazzon E, Muia C, Crisafulli C, Terrana D, Greco S, Britti D, Santori D, Oteri G, Cordasco G, Cuzzocrea S. Effects of etanercept, a tumour necrosis factor-α antagonist, in an experimental model of periodontitis in rats. Br J Pharmacol, 2007;150: 286–97.

75. 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: 1062-8.

76. Diplock AT. Antioxidantsand free radical scavengers, In Evans CA, Burdon RH, editors. Free Radical Damge and its Control. Nedherlands. Elsevier Science B.V. 1994: 113-30.

77. Doan T, Melvold R, Viselli S, Waltenbaugh C. Lippincott's Illustrated Reviews: Immunologoy. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins. 2008: 65-8.

78. Duarte PM, Rocha M, Sampaio E, Mestnik JM, 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: 1056-63.

79. Ebert R, Jakob F. Selenium deficiency as a putative risk factor for osteoporosis. International Congress Series. 2007;1297: 158–64.

80. Ehrlich HP, Tarver H, Hunt TK. Inhibitory effects of vitamin E on collagen synthesis and wound repair Ann. Surg, 1972;175: 235-40.

81. Ejeil AL, Gaultier F, Tchen SI, Senni K, Pellat B, Godeau G, Gogly B. Are cytokines linked to collagen breakdown during periodontal disease progression? J Periodontol, 2003;74: 196-201.

82. Ekuni D, Tomofuji T, Yamanaka R, Tachibana K, Yamamoto T, Watanabe T. Initial apical migration of junctional epithelium in rats following application of lipopolysaccharide and proteases J Periodontol, 2005;76: 43-8.

83. Eley BM.& Cox SW. Proteolytic and hydrolytic enzymes from putative periodontal pathogens: characterization, molecular genetics, effects on host defenses and tissues and detection in gingival crevice fluid. Periodontol 2000, 2003;31: 105-24.

84. Emsley J. The Elements Third Edition. New York. Oxford University Pres. 1998: 188-89.

85. Erganiş O, İstanbulluoğlu E. İmmünoloji. Konya. Birinci basım. Mimoza Yayınları 1993: 81-92.

86. Esaki T, Hayashi T, Muto E, Kano H, Kumar TN, Asai Y, Sumi D, Iguchi A. Expression of inducible nitric oxide synthase and fas/fas ligand correlates with the incidence of apoptotic cell death in atheromatous plaques of human coronary arteries. Nitric Oxide: Biology and Chemistry, 2000;4: 561-71.

87. Fang W, Han A, Bi X, Xiong B, Yang W. Tumor inhibition by sodium selenite is associated with activation of c-Jun NH2-terminal kinase1 and suppression of β-catenin signaling. Int. J.Cancer, 2010;127: 32–42.

88. Figueredo CMS, Ribeiro MSM, Fischer RG, Gustafsson A. Increased interleukin-1β concentration in gingival crevicular fluid as a characteristic of periodontitis. J Periodontol, 1999;70: 1457-63.

89. Flemming TF. Periodontitis. Ann Periodontol, 1999;4: 32-7.

90. Fonseca SG, Romao PRT, Figueiredo F, Morais RH, Lima HC, Ferreira SH, Cunha FQ. TNF-α mediates the induction of nitric oxide synthase in macrophages but not in neutrophils in experimental cutaneous leishmaniasis. Eur. J. Immunol, 2003;33: 2297–306.

91. FornerL, Neilson CH, Bendtzen K, Larsen T, Holmstrup P. Increased plasma levels of IL-6 in bacteremic periodontis patients after scaling. J Clin Periodontol, 2006;33: 724–9.

92. Fredriksson M, Gustafsson A, Asman B, Bergström K. Hyper-reactive peripheral neutrophils in adult periodontitis: generation of chemiluminescence and intracellular hydrogen peroxide after in vitro priming and FcγR-stimulation. J. Clin. Periodontol, 1998;25: 394-8.

93. 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: 817–28.

94. Galleron S, Borderie D, Ponteziere CH, Lemarechal H, Jambou M, Roch-Arveiller M, Ekindjian OG, Cals MJ. Reactive oxygen species induce apoptosis of synoviocytes invitro α-tocopherol provides no protection. Cell Biol Int, 1999;23: 637–42.

95. 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: 517-25.

96. Gamonal J, Sanz M, O'Connor A, Acevedo A, Suarez I, Sanz A, Martinez B, Silva A. Delayed neutrophil apoptosis in chronic periodontitis patients. J Clin Periodontol, 2003;30: 616-23.

97. Garrel C, Fontecave M. Nitric oxide: Chemistry and biology. In Favier AE, Cadet J, Kalyanaraman B, Fontecave M, Pierre JL, editors Analysis of Free Radicals in Biological Systems Birinci baskı. Almanya. Birkhauser Verlag. 1995: 21-35.

98. Gastman BR. Apoptosis and its clinical impact. Head Neck, 2001;23: 409-25.

99. Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. Periodontol 2000, 1997;14: 112-43.

100. Gemmell E, Seymour GJ. Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profile in periodontal disease. Periodontol 2000. 2004;35: 21-41.

101. Giadinis N, Koptopoulos G, Roubies N, Siarkou V, Papasteriades A. Selenium and vitamin E effect on antibody production of sheep vaccinated against enzootic abortion (Chlamydia psittaci). Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases, 2000;23: 129-37.

102. Giannobile WV. Host-response therapeutics for periodontal diseases. J Periodontol, 2008;79: 1592-1600.

103. Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. J Periodontol, 2003;74: 391-401.

104. 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. J Neuroimmunol, 2004;149: 101–9.

105. 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. J Neuroimmunol, 2005;169: 97–105.

106. Gorska R, Gregorek H, Kowalski J, Laskus-Perendyk A, Syczewska M, Madalinski 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: 1046–52.

107. Graves D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. J Periodontol, 2008;79: 1585-91.

108. Grundling M, Rickert S, Saeger D, Pavlovic D, Usichenko T, Meissner K, Wendt M, Hung O, Murphy M, Whynot S, Lehmann C. Acute high-dose sodium selenite administration improves intestinal microcirculation without affecting cytokine release in experimental endotoxemia. Journal of Trace Elem Med Biol, 2009;23: 138–43.

109. Higuchi T, Kinoshita A, Takahashi K, Oda S, Ishikawa I. Bone regeneration by recombinant human bone morphogenetic protein-2 in rat mandibular defects. an experimental model of defect filling. J Periodontol, 1999;70: 1026-31.

110. Hirose M, Ishihara K, Saito A, Nakagawa T, Yamada S, Okuda K. Expression of cytokines and inducible nitric oxide synthase in inflamed gingival tissue. J Periodontol, 2001;72: 590-7.

111. Holt SC, Ebersole JL. Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, Tannerella forsythia: the 'red complex', a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. Periodontol 2000, 2005;38: 72-122.

112. Houde V, Grenier D, Chandad F. Protective effects of grape seed proanthocyanidins against oxidative stress induced by lipopoysaccharides of periodontopathogens. J Periodontol, 2006;77: 1371-9.

113. Hsiao G, Lee JJ, Chen YiC, Lin JH, Shen MY, Lin KH, Chou DS, Sheu JR. Neuroprotective effects of PMC, a potent α-tocopherol derivative, brain ischemia-reperfusion: Reduced neutrophil activation and anti-oxidant actions. Biochem Pharmacol, 2007;73: 682-93

114. Hudak SA, Gollnick SO, Conrad DH, Kehry MR. Murine B-cell stimulatory factor 1 (interleukin 4) increases expression of the Fc receptor for IgE on mouse B cells. Proc. Natl. Acad. Sci. Immunology, 1987;84: 4606-10.

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

116. Ide M, McPartlin D, Coward PY, Crook M, Lumb P, Wilson RF. Effect of treatment of chronic periodontitis on levels of serum markers of acute-phase inflammatory and vascular responses. J Clin Periodontol, 2003;30: 334–40.

117. Ikeda U, Maeda Y, Shimada K. Inducible nitric oxide synthase and atherosclerosis. Clin. Cardiol, 1998;21: 473-6.

118. Imamura T. The role of gingipains in the pahogenesis of periodontal disease J Periodontol, 2003;74: 111-8.

119. Informational Paper. The pathogenesis of periodontal diseases. J Periodontol, 1999;70: 457-70.

120. Isenberg JS, Ridnour LA, Espey MG, Wink DA, Roberts DD. Nitric oxide in wound-healing. Microsurgery, 2005;25: 442-51.

121. 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: 1065-71.

122. Jaspers I, Zhang W, Brighton LE, Carson JL, Styblo M, Beck MA. Selenium deficiency alters epithelial cell morphology and responses to influenza. Free Radical Biology&Medicine, 2007;42: 1826–37.

123. Jimi E, Nakamura I, Duong LT, Ikebe T, Takahashi N, Rodan GA, Suda T. Interleukin1 induces multinucleation and bone-resorbing activity of osteoclasts in the absence of osteoblasts/stromal cells. Exp Cell Res, 1999;247: 84–93.

124. Jones L, Atkins P. Chemistry Molecules, Matter and Change. İkinci baskı. USA. Bilim yayıncılık. 1999: 776-79.

125. Johnstone MA, Koh A, Goldberg MB, Glogauer M. A Hyperactive neutrophil phenotype in patients with refractory periodontitis. J Periodontol, 2007;78: 1788-94.

126. Kantarcı A, Oyaizu K, Van Dyke TE. Neutrophil-mediated tissue injury in periodontal disease pathogenesis: findings from localized aggressive periodontitis. J Periodontol, 2003;74: 66-75.

127. Karakilçik AZ, Hayat A, Zerin M, Çay M. Effects of intraperitoneally injected selenium and vitamin E in rats anesthetized with halothane. J. Trace Elem. Med. Biol, 2003;17: 33-8.

128. Kaushansky K, Lin N, Adamson JW. Interleukin-1 stimulates fibroblasts to synthesize granulocyte-macrophage and granulocyte colony-stimulating factors. J Clin Invest, 1988;81: 92-7.

129. Kawai T, Eisen-Lev R, Seki M, Eastcott JW, Wilson ME, Taubman MA. Requirement of B7 costimulation for Th1-mediated inflammatory bone resorption in experimental periodontal disease. J. Immunol, 2000;164: 2102-9.

130. Kaya N. Biyokimya. Erzurum. Atatürk Üniversitesi Basımevi 1993: 248-9.

131. Kayaalp SO. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 11. baskı. Ankara. Hacettepe-Taş. 2005;1316-21.

132. Khanduja LK, Avti PK, Kumar S, Pathania V, Pathak CM. Inhibitory effect of vitamin E on proinflammatory cytokines-and endotoxin-induced nitric oxide release in alveolar macrophages. Life Sciences, 2005;76: 2669–80.

133. Kiang JG, Krishnan S, Lu X, Li Y. Inhibition of inducible nitric-oxide synthase protects human T cells from hypoxia-induced apoptosis. Mol Pharmacol, 2008;73: 738–47.

134. Kim JE, Shklar G. The effect of vitamin e on the healing og gingival wounds in rats. J Periodontol, 1983: 305-9.

135. Kim IY, Stadtman TC. Inhibition of NF-κB DNA binding and nitric oxide induction in human T cells and lung adenocarcinoma cells by selenite treatment. Proc. Natl. Acad. Sci. Biochemistry, 1997;94: 12904–7.

136. Kirmizis D, Chatzidimitriou D. Antiatherogenic effects of vitamin E: the search for the Holy Grail. Vasc Health Risk Manag, 2009;5: 767-74.

137. Kong G, Kim EK, Kim WS, Lee KT, Lee YW, Lee JK, Paik SW, Rhee JC. Role of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in pancreatic cancer. J Gastroenterol Hepatol, 2002;17: 914–21.

138. Kornman KS. Mapping the pathogenesis: a new look. J Periodontol, 2008;79: 1560-8.

139. Kowaltowski AJ, Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondria and reactive oxygen species. Free Radical Biology&Medicine, 2009;47: 333-43.

140. Kramer JM, Gaffen SL. Interleukin-17: A new paradigm in inflammation, autoimmunity, and therapy. J Periodontol, 2007;78: 1083-93.

141. Kuhr A, Popa-Wagner A, Schmoll H, Schwahn C, Kocher T. Observations on experimental marginal periodontitis in rats. J Periodont Res, 2004;39: 101–6.

142. Kumar MS, Selvam R. Supplementation of vitamin E and selenium prevents hyperoxaluria in experimental urolithic rats. J Nutr Biochem, 2003;14: 306–13.

143. Landvik S. Vitamin E.In Baskin SI, Salem H, editors. Oxidants, Antioxidants, And Free Radicals Maryland. Taylor&Francis. 2001:79-93.

144. Lappin DF, Kjeldsen M, Sander L, Kinane DF. Inducible nitric oxide synthase expression in periodontitis. J Periodont Res, 2000;35: 369-73.

145. Lawen A. Apoptosis-an introduction. BioEssays, 2003;25: 888-96.

146. Leitao RFC, Rocha FAC, Chaves HV, Lima V, Cunha FQ, Ribeiro RA, Brito GAC. Locally applied isosorbide decreases bone resorption in experimental periodontitis in rats. J Periodontol, 2004;75: 1227-32

147. Leitao 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: 956-63.

148. Levander OA. Selenium. In Mertz W, editors. Trace Elements in Human and Animal Nutrition-Fifth Edition. London. Academic Pres. 1986: 209-70.

149. Levine AD. Apoptosis: implications for inflammatory bowel disease. Inflammatory Bowel Diseases 2000; 6: 191-205.

150. Levinson W, Jawetz E. Tıbbi Mikrobiyoloji ve İmmünoloji. Beşinci baskı. İstanbul. Prentice-Hall ve Barış Kitabevi 1998: 348-53.

151. Li WM, Weigand MA, Giaisi M, Süss D, Treiber MK, Baumann S, Ritsou E, Breitkreutz R, Krammer PH. Vitamin E inhibits CD95 ligand expression and protects T cells from activation-induced cell death. J Clin Invest, 2002;110: 681–90.

152. Li W, Hellsten A, Jacobsson LS, Blomqvist HM, Olsson AG, Yuan XM. Alpha-tocopherol and astaxanthin decrease macrophage infiltration, apoptosis and vulnerability in atheroma of hyperlipidaemic rabbits. J Mol Cell Cardiol, 2004;37: 969–78.

153. Lichtman AH, Chint J, Schmidt JA, Abbas AK. Role of interleukin 1 in the activation of T lymphocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. Immunology, 1988;85: 9699-703.

154. 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.

155. Listgarten MA. Pathogenesis of periodontitis. J Clin Periodontol, 1986;13: 418-25.

156. Liu YCG, Lerner UH, Teng YTA. Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles. Periodontol 2000, 2010;52: 163–206.

157. Liversidge J, Dick A, Gordon S. Nitric oxide mediates apoptosis through formation of peroxynitrite and fas/fas-ligand interactions in experimental autoimmune uveitis. Am J Pathol, 2002;160: 905-16.

158. Lohinai Z, Benedek P, Feher E, Györfi A, Rosivall L, Fazekas A, Salzman AL, Szabo C. Protective effects of mercaptoethylguanidine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase, in ligature-induced periodontitis in the rat. Br J Pharmacol, 1998;123: 353-60.

159. Lohinai Z, Stachlewitz R, Virag L, Szekely AD, Hasko G, Szabo C. Evidence for reactive nitrogen species formation in the gingivomucosal tissue J Dent Res, 2001;80: 470-5.

160. Loro LL, Vintermyr OK, Johannessen AC. Apoptosis in normal and diseased oral tissues. Oral Dis, 2005;11: 274-87.

161. Loos BG, Craandijk J, Hoek FJ, Wertheim-van Dillen PME, van der Velden U. Elevation of systemic markers related to cardiovascular diseases in the peripheral blood of periodontitis patients. J Periodontol, 2000;71: 1528-34.

162. Lowe GDO. The relationship between infection, iflammation, and cardiovascular disease: an overview. Ann Periodontol, 2001;6: 1-8.

163. Maehira F, Miyagi I, Eguchi Y. Selenium regulates transcription factor NF-κB activation during the acute phase reaction. Clin Chim Acta, 2003;334: 163–71.

164. MacWilliam L. Report: What Makes Gamma Tocopherol Superior to Alpha Tocopherol. Life Extension Mag. April 2006. Available from http://www.lef.org/magazine/mag2006/apr2006_report_gamma_01.htm.

165. Mahan DC, Cline TR, Richert B. Effects of dietary levels of selenium-enriched yeast and sodium selenite as selenium sources fed to growing-finishing pigs on performance, tissue selenium, serum glutathione peroxidase activity, carcass characteristics, and loin quality. J. Anim. Sci, 1999;77: 2172–9.

166. Marcaccini AM, Meschiari CA, Sorgi CA, Saraiva MCP, Souza AM, Faccioli LH, Tanus-Santos JE, Novaes AB, Gerlach RF. Circulating interleukin-6 and high-sensitivity c-reactive protein decrease after periodontal therapy in otherwise healty subjects. J Periodontol, 2009;80: 594-602.

167. Mol MJTM, deRijke 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: 169-76.

168. Moreno-Reyes R, Egrise D, Neve J, Pasteels JL, Schoutens A. selenium deficiency–induced growth retardation is associated with an impaired bone metabolism and osteopenia. J Bone Miner Res, 2001;16: 1556–63.

169. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell WW. Harper'ın Biyokimyası. Yirmidördüncü baskı. İstanbul. Barış Kitabevi. 1999: 657-60.

170. Nadege B, Patrick L, Rodrigue R. Mitochondria: from bioenergetics to the metabolic regulation of carcinogenesis. Frontiers in Bioscience 2009;14: 4015-4034. Available from http://www.bioscience.org/2009/v14/af/3509/figures.htm.

171. Nagano T. Bioimaging probes for reactive oxygen species and reactive nitrogen species. J Clin Biochem. Nutr, 2009;45: 111-24.

172. Napoli C, Ignarro LJ. Nitric oxide and pathogenic mechanisms involved in the development of vascular diseases. Arch Pharm Res, 2009;32: 1103-1108.

173. Navarro-Alarcon M, Cabrera-Vique C. Selenium in food and the human body: A review. Science of the Total Environment, 2008;400: 115-141.

174. Nazıroğlu M, Karaoğlu A, Aksoy AO. Selenium and high dose vitamin E administration protects cisplatin-induced oxidative damage to renal, liver and lens tissues in rats. Toxicology, 2004;195: 221–30.

175. Nisengard RJ, Hake SK, Newman MG, Miyasaki KT. Microbial Interactions with the Host in Periodontal Disease In Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR, Carranza FA,editors. Clinical Periodontology. Tenth Edition. China. W. B Saunders Company. 2009: 228-50.

176. 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: 195–9.

177. Novak MJ. Classification of Diseases and Affecting the Periodontium, In Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR, Carranza FA,editors. Clinical Periodontology. Tenth Edition. China. W. B Saunders Company. 2009: 100-9.

178. Oh TY, Yeo M, Han SU, Cho YK, Kim 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: 1447-57.

179. Oh HI, Shim JS, Gwon SH, Kwon HJ, Hwang JK. The effect of xanthorrhizol on the expression of matrix metalloproteinase-1 and Type-I procollagen in ultraviolet-irradiated human skin fibroblasts. Phytother. Res, 2009;23: 1299–302.

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

181. Oppenheim JJ, Ruscetti FW, Faltneyk CR. Interleukins & Interferons. In Stites DP, Stobo JD, Wells JV, editors. Basic&Clinical Immunology. Sixth Edition. Beirut. 1987: 82-7.

182. Pae HO, Lee C, Jo EK, Chung HT. Subtle interplay of endogenous bioactive gases (NO, CO and H_2S) in inflammation. Arch Pharm Res, 2009;32: 1155-62.

183. Page CR, Kornman SK. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. Periodontol 2000, 1997;14: 9-11.

184. Palmqvist P, Lundberg P, Lundgren I, Hänström L, Lerner UH. IL-1β and TNF-α regulate IL-6-type cytokines in gingival fibroblasts. J Dent Res, 2008;87: 558-63.

185. Pappas AC, Zoidis E, Surai PF, Zervas G. Selenoproteins and maternal nutrition. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B. 2008;151: 361-72.

186. Parrish JH, DeMarco TJ, Bissada NF**.** Vitamin E and periodontitis in the rat. Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, 1977;44: 210-8.

187. Paquette DW, Rosenberg A, Lohinai Z, Southan GJ, Williams RC, Offenbacher S, Szabo C. Inhibition of experimental gingivitis in beagle dogs with topical mercaptoalkylguanidines. J Periodontol, 2006;77: 385-91.

188. Patel PS, Pradeep AR, Chowdhry S. Crevicular fluid levels of plasma glutathione peroxidase (eGPx) in periodontal health and disease Arch Oral Biol, 2009;54: 543–8.

189. Pene J, Rousset F, Briere F, Chretien I, Bonnefoy JY, Spits H, Yokota T, Arai N, Arai KI, Banchereau J, De Vries JE. IgE production by normal human lymphocytes is induced by interleukin 4 and suppressed by interferons γ and α and prostaglandin E_2. Proc. Natl. Acad. Sci Immunology, 1988;85: 6880-6884.

190. Peter ME, Krammer PH. Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. Current Opinion in Immunology 1998;10: 545-51.

191. Pike BL, Nossal GJV. Interleukin 1 can act as a B-cell growth and differentiation factor. Proc. Natl. Acad. Sci. Immunology, 1985;82: 8153-7.

192. Polak D, Wilensky A, Shapira L, Halabi A, Goldstein D, Weiss EI, Houri-Haddad Y. Mouse model of experimental periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response. J Clin Periodontol, 2009;36: 406–10.

193. Porth CM. Kunert MP. Pathophysiology Concepts of Altered Health States. Sixth Edition. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins. 2002: 105-6

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

195. Prabhu KS, Zamamiri-Davıs F, Stewart JB, Thompson JT, Sordillo LM, Reddy CC. Selenium deficiency increases the expression of inducible nitric oxide synthase in RAW 264.7 macrophages: role of nuclear factor-κB in up-regulation. Biochem. J, 2002;366: 203-9.

196. Preshaw PM, Hefti AF, Jepsen S, Etienne D, Walker C, Bradshaw MH. Subantimicrobial dose doxycycline as adjunctive treatment for periodontitis. A revie. J Clin Periodontol, 2004;31: 697–707.

197. Ratasirayakorn W, Leone P, Leblebicioğlu B, Walters JD. Polyamines found in the inflamed periodontium inhibit priming and apoptosis in human polymorphonuclear leukocytes J Periodontol, 1999;70: 179-84.

198. 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.

199. Rao CV, Vijayakumar M. Effect of quercetin, flavonoids and α-tocopherol, an antioxidant vitamin on experimental reflux oesophagitis in rats. European Journal of Pharmacology, 2008;589: 233–8.

200. Reimund JM, Allison AC, Muller CD, Dumont S, Kenney JS, Baumann R, Duclos B, Poindron P.Antioxidants inhibit the in vitro production of inflammatory cytokines in Crohn disease and ulcerative colites. Eur J İnvest, 1998;28: 145-50.

201. Reiter E, Jiang Q, Christen S. Anti-inflammatory properties of α- and γ-tocopherol. Mol Aspects Med, 2007;28: 668-91.

202. Reynolds JJ, Meikle MC. Mechanisms of connective tissue matrix destruction in periodontitis. Periodontol 2000, 1997;14: 144-57.

203. Ricciarelli R, Maroni P, Ozer N, Zingg JM, Azzı A. Age-dependent increase of collagenase expression can be reduced by α-tocopherol via protein kinase c inhibition. Free Radical Biology & Medicine, 1999;27: 729–37.

204. Ridker PM, Silvertown JD. Inflammation, c-reactive protein and atherothrombosis. J Periodontol, 2008;79: 1544-51.

205. Rodrigo R, Guichard C, Charles R. Clinical pharmacology and therapeutic use of antioxidant vitamins. Fundamental & Clinical pharmacology, 2007;21: 111-27.

206. Rogers JE, Li F, Coatney DD, Rossa Jr. C, Bronson P, Krieder JM, GiannobileWV, Kirkwood KL. Actinobacillus actinomycetemcomitans lipopolysaccharide-mediated experimental bone loss model for aggressive periodontitis. J Periodontol, 2007a;78: 550-8.

207. Rogers JE, Li F, Coatney DD, Otremba J, Kriegl JM, Protter AA, Higgins LS, Medicherla S, Kirkwood KL. A p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor arrests active alveolar bone loss in a rat periodontitis model. J Periodontol, 2007b;78: 1992-8.

208. Roques CG, El kaddouri S, Barthet P, Duffort JF, Arellano M. Fusobacterium nucleatum involvement in adult periodontitis and possible modification of strain classification J Peiodontol, 2000;71: 1144-50.

209. Rudolf E, Rudolf K, Červinka M. Selenium activates p53 and p38 pathways and induces caspase-independent cell death in cervical cancer cells. Cell Biol Toxicol, 2008;24: 123–41.

210. Sadir S, Deveci S, Korkmaz A, Oter Ş. Alpha-tocopherol, beta-carotene and melatonin administration protects cyclophosphamide-induced oxidative damage to bladder tissue in rats. Cell Biochem Funct, 2007;25: 521-26.

211. Sakaguchi S, Iizuka Y, Furusawa S, Tanaka Y, Takayanagi M, Takayanagi Y. Roles of selenium in endotoxin-induced lipid peroxidation in the rats liver and in nitric oxide production in J774A.1cells. Toxicology Letters, 2000;118: 69–77.

212. Salerno C, Capuozzo E, Crifò C, Siems W. α-Tocopherol increases caspase-3 up-regulation and apoptosis by β-carotene cleavage products in human neutrophils. Biochim Biophys Acta, 2007;1772: 1052–6.

213. Sawa T, Nishimura F, Ohyama H, Takahashi K, Takashiba S, Murayama Y. In vitro induction of activation-induced cell death in lymphocytes from chronic periodontal lesions by exogenous fas ligand. Infect Immun, 1999;67: 1450–4.

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

215. Schwartz Z, Goultschin J, Dean DD, Boyan BD. Mechanisms of alveolar bone destruction in periodontitis. Periodontol 2000, 1997;14: 158-72.

216. Seymour GJ, Gemmell E. Cytokines in periodontal disease: where to from here? Acta Odontol Scand, 2001;59: 167–73.

217. Sharma CGD, Pradeep AR. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies: a renewed paradigm in periodontal disease pathogenesis? J Periodontol, 2006;77: 1304-13.

218. Sheikhi M, Gustafsson A, Jarsrand C. Cytokine, elastase and oxygen radical release by Fusobacterim nucleatum-activated leukocytes: a possible pathogenic factor in periodontitis. J Clin Periodontol, 2000;27: 758-62.

219. Shen XH, Cheng VF, Li XH, Sun JQ, Li F, Ma L, Xie LM. Effects of dietary supplementation with vitamin E and selenium on rat hepatic stellate cell apoptosis. World J Gastroenterol, 2005;11: 4957-61.

220. Shibata K, Warbington ML, Gordon BJ, Kurihara H, Van Dyke TE. Nitric oxide synthase activitiy in neutrophils from patients with localized aggressive periodontitis. J Periodontol, 2001;72: 1052-58.

221. 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.

222. Singh U, Jialal I. Anti-inflammatory effects of α-tocopherol. Ann N Y Acad Sci, 2004;1031: 195-203.

223. Sodhi S, Sharma A, Brar APS, Brar RS. Effect of α tocopherol and selenium on antioxidant status, lipid peroxidation and hepatopathy induced by malathion in chicks. Pestic Biochem Physiol, 2008;90: 82–6.

224. Sorkin BC, Niederman R. Short-chain carboxylic acids decrease human gingival keratinocyte proliferation and increase apoptosis and necrosis J Clin Periodontol, 1998;25: 311-5.

225. Splettstoesser WD, Schuff-Werner P. Oxidative stres in phagocytes-‘‘the enemy within’’. Microsc Res Tech, 2002;57: 441-55.

226. SPSS. Statistical Package for the Social Sciences 15.0. 2007. Avalible from URL: http://www.spss.com/

227. Stashenko P, Jandinski JJ, Fujiyoshi P, Rynar J, Socransky SS. Tissue levels of bone resorptive cytokines in periodontal disease. J Periodontol, 1991;62: 504-9.

228. Stehle HW, Leblebicioğlu B, Walters JD. Short-chain carboxylic acids produced by gram-negative anaerobic bacteria can accelerate or delay polymorphonuclear leukocyte apoptosis in vitro. J Periodontol, 2001;72: 1059-63.

229. Steel DM, Whitehead AS. Heterogeneous modulation of acute-phase-reactant mRNA levels by interleukin-1β and interleukin-6 in the human hepatoma cell line PLC/PRF/5. Biochem. J, 1991;277: 477-82.

230. Struillou X, Boutigny H, Soueidan A, Layrolle P. Experimental animal models in periodontology: a review. Open Dent J, 2010,4: 37-47.

231. Takane M, Sugano N, Iwasaka H, Iwano Y, Shimizu N, Ito K. New biomarker evidence of oxidative DNA damage in whole saliva from clinically healty and periodonally diseased individuals. J Periodontol, 2002;73: 551-4.

232. Takeuchi Y, Umeda M, Sakamoto M, Benno Y, Huang Y, Ishikava I. Treponema socranskii, Treponema denticola, and Porphyromonas gingivalis are associated with severity of periodontal tissue destruction. J Periodontol, 2001;72: 1354-63.

233. Tamaki N, Tomofuji T, Ekuni D, Yamanaka R, Yamamoto T, Morita M. Short-term effects of non-surgical periodontal treatment on plasma level of reactive oxygen metabolites in patients with chronic perioontitis. J Periodontol, 2009;80: 901-6.

234. Tani-Ishii N, Minamida G, Saitoh D, Chieda K, Omuro H, Sugaya A, Hamada N, Takahashi Y, Kiyohara S, Kashima I, Teranaka T, Umemoto T. Inhibitory effects of incadronate on the progression of rat experimental periodontitis by Porphyromonas gingivalis infection. J Periodontol, 2003;74: 603-9.

235. Tanner ACR, Izard J. Tannerella forsythia, a periodontal pathogen entering the genomic era. Periodontol 2000, 2006;42: 88-113.

236. Taubman MA, Kawai T. Involvement of T-lymphocytes in periodontal disease and in direct and indirect induction of bone resorption. Crit Rev Oral Biol Med, 2001;12: 125-35.

237. Taubman MA, Valverde P, Han X, Kawai T. Immune response: the key to bone resorption in periodontal disease. J Periodontol, 2005;76: 2033-41

238. Teng YTA. The role of acquired immunity and periodontal disease progresion. Crit Rev Oral Biol Med, 2003;14: 237-52.

239. Timmer T, de Vries EGE, de Jong S. Fas receptor-mediated apoptosis: a clinical application? J Pathol, 2002;196: 125-34.

240. Thompson SA. Campylobacter surface-layers (S-Layers) and immune evasion. Ann Periodontol, 2002;7: 43-53.

241. Thorburn A. Death receptor-induced cell killing. Cellular Signalling, 2004;16: 139-44.

242. Thomassen Y, Lewis SA, Veillon C. Selenium In Herber RFM, Stoeppler M, editors. Trace Element Analysis in Biological Specimens Amsterdam. Elsevier. Science BV. 1994: 489-98.

243. Toker H, Ozdemir H, Eren K, Ozer H, Sahın G. N-Acetylcysteine, a thiol antioxidant, decreases alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. J Periodontol, 2009;80: 672-8.

244. Tong WM, Wang F. Alterations in rat pancreatic islet β cells induced by keshan disease pathogenic factors: protective action of selenium and vitamin E. Metabolism, 1998;47:415-9.

245. 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: 1799-808.

246. Trace'89 Proceedings of the Third International Congress on Trace Elements in Health and Disease at Adana (Turkey). Adana. Cukurova University Publishing Company. 1989: 11-19.

247. Tsukahara Y, Morisaki T, Kojima M, Uchiyama A, Tanaka M. iNOS expression by activated neutrophils from patients with sepsis. ANZ J. Surg, 2001;71: 15–20.

248. Uemura M, Manabe H, Yoshida N, Fujita N, Ochiai J, Matsumoto N, Takagi T, Naito Y, Yoshikawa T. α-Tocopherol prevents apoptosis of vascular endothelial cells via a mechanism exceeding that of mere antioxidation. Eur J Pharmacol, 2002;456: 29–37.

249. Üstdal KM, Karaca L, Türköz Y, Testereci H, Kuş S, Paşaoğlu H. Biyokimya. Malatya. Medipres. 2003: 170-1.

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

251. Van Dyke TE, Cutler CW, Kowolik M, Singer RS, Buchanan W, Biesbrock AR. Effect of topical cimetidine rinse on gingival crevicular neutrophil leukocyte function. J Periodontol, 2005;76: 998-1005.

252. Vidal F, Figueredo CMS, Cordovil I, Fischer RG. Periodontal therapy reduces plasma levels of interleukin-6, c-reactive protein, and fibrinogen in patients with severe periodontitis and refractory arteriel hypertension. J Periodontol, 2009;80: 786-91.

253. Walston J, Xue Q, Semba RD, Ferrucci L, Cappola AR, Ricks M, Guralnik J, Fried LP. Serum antioxidants, inflammation, and total mortality in older women. Am J Epidemiol, 2006;163: 18–26.

254. Weber ML, Krammer PH. Function and regulation of the CD95 (APO-1/Fas) ligand in the immune system. Seminars in Immunology, 2003;15: 145–57.

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

256. World Health Organization. Trace elements in human nutrition and health. Geneva. 1996: 105-122.

257. Wu J, Wilson J, He J, Xiang L, Schur PH, Mountz JD. Fas-ligand mutation in a patient with systemic lupus erythematosus and lymphoproliferative disease J. Clin. Invest, 1996;98: 1107–13.

258. Yamazaki K. Yoshie H, Seymour GJ. T cell regulation of the immune response to infection in periodontal diseases. Histol Histopathol, 2003;18: 889-96.

259. Yeğin O. Temel İmmünoloji ve İmmün Eksiklik Hastalıkları. 1992: 87-100.

260. Yeo JE, Kang SK. Selenium effectively inhibits ROS-mediated apoptotic neural precursor cell death in vitro and in vivo in traumatic brain injury. Biochim Biophys Acta, 2007;1772: 1199–210.

261. Yoon SO, Kim MM, Park SJ, Kim D, Chung J, Chung AS. Selenite suppresses hydrogen peroxide-induced cell apoptosis through inhibition of ASK1 / JNK and activation of PI3-K / Akt pathways. The Faseb Journal 2001 express article 10.1096/fj.01-0398fje.

262. Yun CH, Yang JS, Kang SS, Yang Y, Cho JH, Son CG, Han SH. NF-κB signaling pathway, not IFN-β/STAT1, is responsible for the selenium suppression of LPS-induced nitric oxide production. Int Immun pharmacol. 2007;7: 1192–8.

263. Zafar KS, Siddiqui A, Sayeed I, Ahmad M, Salim S, Islam F. Dose-dependent protective effect of selenium in rat model of Parkinson's disease: neurobehavioral and neurochemical evidens. J. Neurochem, 2003;84: 438-46.

264. Zambon JJ. Actinobacillus actinomycetemcomitans in human periodontal disease. J Clin Periodontology, 1985;12: 1-20.

265. Zee E, Everts V, Beertsen W. Cytokines modulate routes of collagen breakdown. J Clin Periodontol, 1997;24: 297-305.

266. Zeng J, Zhou J, Huang K. Effect of selenium on pancreatic proinflammatory cytokines in streptozotocin-induced diabetic mice. J Nutr Biochem, 2009;20: 530–6.

267. Zhan XA, Wang M, Zhao RQ, Li WF, Xu ZR. Effects of different selenium source on selenium distribution, loin quality and antioxidant status in finishing pigs. Animal Feed Science and Technology, 2007;132: 202–11.

268. Zhang A, Cao JL, Yang B, Chen JH, Zhang ZT, Li SY, FuQ, Hugnes CE, Caterson B. Effects of moniliformin and selenium on human articular cartilage metabolism and their potential relationships to the pathogenesis of Kashin-Beck disease. Biomed & Biotechnol. 2010;11: 200-8.

269. Zhou Y, Zhang S, Liu C, Cai Y. The protection of selenium on ROS mediated-apoptosis by mitochondria dysfunction in cadmium-induced LLC-PK1 cells. Toxicol in Vitro. 2009;23: 288–94.

270. Zou Y, Niu P, Yang J, Yuan J, Wu T, Chen X. The JNK signaling pathway is involved in sodium-selenite-induced apoptosis mediated by reactive oxygen in HepG2 cells. Cancer Biol Ther, 2008;7: 691-98.

10. ÖZGEÇMİŞ

22 Mart 1978'de Karaman'ın Ayrancı ilçesinde doğdu. İlkokulu Konya Ereğli Şehit Kamil Atalay İlkokulunda, orta öğrenimini Konya Ereğli Lisesinde tamamladıktan sonra Ankara Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesinden 2001 yılında mezun oldu. 2005 yılında Selçuk Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilimdalında doktora öğrenimine başladı. Halen aynı anabilim dalında doktora öğrencisi olarak devam etmektedir. Bekardır. Yabancı dili İngilizcedir.