



K.K.T.C.
YAKIN DOĞU ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIÇANLARDA DENEYSEL OLARAK GELİŞTİRİLMİŞ
TEMPOROMANDİBULAR EKLEM ARTRİT MODELİNDE
MELATONİN VE 5-METOKSİTRİPTOFOL'UN KORUYUCU
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Diş Hek. Gökçe SAVTEKİN

**Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Programı
DOKTORA TEZİ**

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Mustafa Şenol TÜZÜM

2. TEZ DANIŞMANI

Yard. Doç. Dr. Ahmet Özer ŞEHİRLİ

LEFKOŞA

2016



Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Programında
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı/Danışman: Prof. Dr. Mustafa Şenol TÜZÜM
Yakın Doğu Üniversitesi

2. Danışman: Yard. Doç. Dr. Ahmet Özer ŞEHİRLİ
Yakın Doğu Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Osman Taha KÖSEOĞLU
Hacettepe Üniversitesi

Üye: Yard. Doç. Dr. Lokman Onur UYANIK
Yakın Doğu Üniversitesi

Üye: Yard. Doç. Dr. Aysa AYALI
Yakın Doğu Üniversitesi

ONAY:

Bu tez, Yakın Doğu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav
Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun
görölmüş ve Enstitü yönetim kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İhsan Çalis
Enstitü Müdürü



TEŞEKKÜR

4 senelik doktora programı boyunca bana verdiği bilgi ve deneyiminden, yeri geldiğinde baba şefkatiyle her daim yanımda olan çok sevgili hocam ve danışmanım, Sayın Prof. Dr. M. Şenol TÜZÜM'e;

Bu tez çalışmasında ve her anımda yanımda olan, kan bağıımız olmasa bile “abim” gibi sevdiğim, duygu, düşünce ve mantık çerçevesinde örnek aldığım değerli hocam ve 2. tez danışmanım, Sayın Yard. Doç. Dr. Ahmet Özer ŞEHİRLİ'ye;

Bana bugünlere gelmemde yardımda bulunan ve bilgilerini esirgemeyen değerli hocalarım, Yard. Doç. Dr. L. Onur UYANIK ve Yard. Doç. Dr. Aysa AYALI'ya;

Çalışmamda değerli bilgilerinden faydalandığım ve analizlerimi yapmada yardımda bulunan değerli hocalarım, Sayın Prof. Dr. Şule Çetinel, Prof. Dr. Ertuğrul Kılıç, Doç. Dr. Aylız Velioğlu ÖĞÜNÇ, Yard. Doç. Dr. Can ERZİK'e;

Bu çalışmanın gerçekleşmesini sağlayan Kurucu Rektörümüz Sayın Dr. Suat GÜNSEL ve Sayın Doç. Dr. İrfan GÜNSEL'e;

Çalışmaya sonsuz desteğini koyan ve değerli bilgilerini benimle paylaşan hakkını ödeyemeyeceğim değerli hocam, Sayın Prof. Dr. Nedime SERAKINCI'ya;

Eğitim ve öğretimimde katkıda bulunan çok değerli Dekanımız, Sayın Prof. Dr. Mutahhar ULUSOY'a;

Desteklerini esirgemeyen çok değerli çalışma arkadaşlarım'a,

Bu süre boyunca tüm duygusal iniş çıkışlarıma katlanıp desteğini hiç esirgemeyen, annem Rüştüye SAVTEKİN, babam Rüstem SAVTEKİN, ablam Tuğçe SAVTEKİN KUŞ, eniştem Cem KUŞ, canımdan çok sevdiğim yeğenim Tuğra KUŞ, değerli eşim, Umut ZEYTİN ve eşimin değerli Ailesi'ne;

SONSUZ TEŞEKKÜRLER...

ÖZET

Savtekin, G. Sıçanlarda Deneysel Olarak Geliştirilmiş Temporomandibular Eklem Artrit Modelinde Melatonin ve 5-Metoksitriptofol'un Koruyucu Etkilerinin İncelenmesi. Yakın Doğu Ünicersitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Programı, Doktora Tezi, Lefkoşa, 2016.

Bu çalışmada , temporomandibular ekleme (TME) zymosan uygulaması ile oluşturulmuş Temporomandibular eklem artrit (TMEA) modelinde nötrofillerin, sitokinlerin ve metaloproteinazların rolü araştırılmış, pineal hormon olan Melatonin (MEL) ve 5-metoksitriptofol'un (5-MTX), bu parametreler üzerindeki etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızda artirit modellemesi için 200-250 gr arası her iki cinsten Wistar albino sıçanlar kullanılmıştır. Artrit modeli, 2 mg Zymosan'ın 40 µl saline içinde çözülüp sıçanların sol Temporomandibular eklemlerine intraartiküler (i.a.) olarak uygulanmasıyla oluşturulmuş kontrol grubu ise sadece 40 µl salinin (i.a) olarak uygulanması ile oluşturulmuştur. MEL ve 5-MTX uygulaması zymosan enjeksiyonundan önce intraperitoneal olarak yapılmıştır. Zymosan ya da saline uygulamasından 6 saat sonra hayvanlardan sinoviyal sıvı toplanmış, histolojik olarak değerlendirmek için sinoviyal membran alınmıştır. Zymosan uygulamalı Temporomandibular eklem artrit (TMEA) modelinde sinoviyal sıvıdaki IL-1β ve TNF-α'nın salınmasını ve metaloproteinaz-2 (MMP-2) ve metaloproteinaz (MMM-9) aktivitesini artırmıştır, MEL ve 5-MTX uygulaması ile bu değerler sham grubuna yaklaşmıştır. Temporomandibular eklem artrit (TMEA) yapılan grupta ekleme ait COX-2 düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Buna karşılık melatonin (MEL), 5-metoksitriptofol (5-MTX) ile MEL+5-MTX uygulanan grupta ise TMEA grubundaki artış anlamlı olarak düşmüş kontrol grubu değerlerine yaklaşmıştır. Temporomandibular eklem artrit (TMEA) yapılan grupta ekleme ait Raf-1 ve STAT-3 düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Buna karşılık melatonin (MEL), 5-metoksitriptofol (5-MTX) ile MEL+5-MTX uygulanan grupta ise TMEA grubundaki artış anlamlı olarak düşmüştür. Sadece MEL ve sadece 5-MTX uygulanan grupta Raf-1 ve STAT3 düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek kalmıştır. Kombine uygulama ile tek başına yapılan uygulamalar arasında ise Raf-1 düzeylerinde sadece MEL uygulanan gruba göre anlamlı olarak azalma görülmüş diğer

parametrede ise farklılık bulunmamıştır. Histolojik olarak değerlendirmede ise inflamasyonda ortaya çıkan sinoviosit yoğunluğundaki artışın tedavi gruplarında oldukça gerileme gösterdiği saptanmıştır. Tüm tedavi gruplarında histolojik olarak artiküler kartilaj dejenerasyonu azalmış olup özellikle MEL ve 5-MTX'in birlikte kullanımında bu durum daha fazladır. Sonuç olarak, MEL ve 5-MTX'in artritte inflamasyonu azaltması bu ajanların klinik açıdan yeni bir tedavi prensibi oluşturabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Zymosan, sinoviyal membran, melatonin, 5-methoksitriptophol

ABSTRACT

Savtekin, G. Investigation of Melatonin and 5-Methoxytryptophol Protective Effects in the Experimental Temporomandibular Joint Atrhritis Model in Rats. Near East University Institute of Health Sciences Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Phd Thesis, Nicosia, 2016.

The aim of this study is the investigation of synoviocytes, cytokines and metalloproteinases in the synovial inflammation model which is created by zymosan application to temporomandibular joint (TMJ) and effects of pineal hormones melatonin (MEL) and 5-methoxytryptophol (5-MTX) on these parameters. 200-250 gr Wistar albino rats of both sexes were used for modeling arthritis in this study. Arthritis model was created by intraarticularly (i.a.) injecting 2 mg zymosan in 40 µl saline into the left temporomandibular joint of the rats while the sham group was created by only injecting 40 µl saline solution (intraarticular). MEL and 5-MTX administration was made intraperitoneal before zymosan injection. 6 hours after zymosan or saline administration of MEL and 5-MTX the synovial fluid was collected from the animals and the synovial membrane was collected for histological assessment. The administration of zymosan TMJ arthritis group increased the release of IL-1 β and TNF- α and the activity of metalloproteinases (MMM-9) and metalloproteinases-2 (MMP-2) and with this administration values got closer to the sham group. COX-2 levels in TMJ of TMJ arthritis group were significantly higher than the control group. In contrast, increase in COX-2 levels of TMJ arthritis group that MEL, 5-MTX and MEL + 5-MTX administered groups have significantly dropped and come closer to control group values. Raf-1 and STAT-3 levels in TMJ of TMJ arthritis group were found significantly higher compared to control group. In contrast, increase in MEL, 5-MTX and MEL + 5-MTX administered TMJ arthritis groups have significantly dropped. Raf-1 and STAT3 of single MEL and single 5-MTX application groups were higher than the control group. Between the combined application and single applications only MEL administered group showed significant reduction in their Raf-1 levels and other parameters showed any variance. The histological evaluation showed significant increase in the intensity of synoviocytes that arose in the inflammation were found to subside. Histologically articular cartilage degeneration has decreased in all

treatment groups in this case is particularly more in the MEL and 5-MTX use together. In conclusion, MEL and 5-MTX reducing inflammation in arthritis suggests these agents might constitute a new therapeutic principle clinically.

Key Words: Zymosan, synovial membrane, melatonin, 5-methoxytryptophol

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Temporomandibular Eklem (TME) Anatomisi	3
2.1.1. Mandibuler Kondil	3
2.1.2. Artiküler Disk	4
2.1.3 Sinoviyal Dokular	5
2.1.4. Ligamentler	6
2.1.5. Temporomandibular Eklemi İnerve Eden Sinir ve Damarlar	8
2.2. Temporomandibular Eklem Rahatsızlıklarının Sınıflaması	9
2.2.1. Artritler	11
2.2.1.1. Osteoartrit/ Osteoartroz	11
2.2.1.2. Poliartrit	12
2.2.1.3. Romatoid Artrit	12
2.2.1.4. İnfeksiyöz Artrit	24
2.2.1.5. Travmatik Artrit	24
2.2.1.6. Psoriatik Artrit	25
2.2.1.7. Metabolik artritler	25
2.3. Melatonin (MEL)	25
2.4. 5-Methoksitriptofol (5-MTX)	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM	34

3.1. Gruplar ve Deney Protokolü	34
3.2. Sinoviyal Sıvıda Tümör Nekrozis Faktör- α (TNF- α) tayini	38
3.3. Sinoviyal Sıvıda İnterlökin- 1 β (IL-1 β) tayini	40
3.4. Sinoviyal Sıvıda Matriks Metalloproteinaz-2 (MMP-2) Tayini	41
3.5. Sinoviyal Sıvıda Matrix Metalloproteinaz-9 (MMP-9) Tayinleri	43
3.6. Siklooksijenaz 1 ve 2 (COX-1, COX-2), Rapidly Accelerated Fibrosarcoma-1 (Raf-1) ve Signall Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3)	44
3.6.1. Ribo Nükleik asit (RNA) İzolasyonu ve complementary-Deoksiriboz Nükleik Asit (cDNA) Preperasyonu	44
3.6.2. Real Time-Polimerase Chain Reaction (RT-PCR) Reaksiyonları	45
3.7. Histolojik İncelemeler	45
3.8. İstatistik Yöntemi	46
4. BULGULAR	47
4.1. Sinoviyal Sıvıya Ait Sonuçlar	47
4.2. Dokuya Ait Sonuçlar	47
4.2.1. Siklooksijenaz-1 ve Siklooksijenaz-2 (COX-1 ve COX-2) Sonuçları	47
4.2.2. Rapidly Accelerated Fibrosarcoma-1 (Raf-1) ve Signall Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) Sonuçları	48
4.3. Histoloji Sonuçları	48
5. TARTIŞMA	55
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	64
KAYNAKLAR	65
EKLER	

SİMGELER VE KISALTMALAR

kg	Kilogram
gr	Gram
mg	Miligram
µl	Mikrolitre
α	Alfa
β	Beta
δ	Delta
%	Yüzde
mL	Mililitre
mm	Milimetre
pg	Pikogram
κB	Kappa B
iNOS	Nitrik oksit Sentaz
PG	Prostoglandin
°C	Santigrat Derece
nm	Nanometre
M	Molarite
SF	Serum Fizyolojik

ŞEKİLLER

2.1: Temporomandibular Eklem	3
2.2: Temporomandibular eklem diski	4
2.3: Sinoviyal kavite	5
2.4: Temporomandibular eklem kapsülü	7
2.5: Temporomandibular eklem ligamentleri	8
2.6: Romatoid artritte rol oynayan “Mitogen Activated Protein Kinases ve Signal Transducer and Activator of Transcription 3” yolları	14
2.7: Romatoid artritte yol açan proinflatuar mediatörler	15
2.8: Melatonin sentez basamakları	27
2.9: Melatonin antiinflatuar mekanizması	29
2.10: 5-metoksitriptofolun seratoninden oluşan sentez yolağı	31
2.11: 5-metoksitriptofolun melatoninden oluşan sentez yolağı	32
3.1: Zymosan (Z4250 Zymosan Sigma-Aldrich)	34
3.2: Sıçana intraartiküler zymosan uygulaması	35
3.3: 5-Methoxytryptophol (Syninnova)	35
3.4: 5-Metoksitriptofol’un intraperitoneal uygulaması	36
3.5: Melatonin (Sigma-Aldrich)	36
3.6: Melatonin intraperitoneal uygulaması	37
3.7: Sinoviyal sıvı toplanması ve rezeke edilen sıçan mandibulası	38
4.1: Sıçanlarda yapılan temporomandibular eklem artrit (TMEA) modelinde tüm grupların sinoviyal sıvıya ait Tumor Nekrosis Faktör- α (TNF- α), Interlökin-1 β (IL-1 β) değerleri.	49
4.2: Sıçanlarda yapılan temporomandibular eklem artrit (TMEA) modelinde tüm grupların sinoviyal sıvıya ait Matriks metaloproteinaz-2 (MMP-2) ve MMP-9 değerleri.	50
4.3: Sıçanlarda yapılan temporomandibular eklem artrit (TMEA) modelinde tüm gruplara ait doku siklooksijenaz-1 (COX-1) ve COX-2 aktiviteleri.	51

4.4: Sıçanlarda yapılan temporomandibular eklem artrit (TMEA) modelinde tüm gruplara ait doku Rapidly Accelerated Fibrosarcoma-1 (Raf-1) ve Signall transducer and activator of transcription 3 (STAT3) düzeyleri.	52
4.5: Sinoviyal dokudaki histolojik inceleme.	53
4.6: Kartilaj dokusundaki histolojik inceleme.	54

TABLOLAR

4.1: Sıçanlarda yapılan temporomandibular eklem artrit (TMEA) modelinde tüm grupların sinoviyal sıvıya ait Tumor Nekrosis Faktör- α (TNF- α), Interlökin-1 β (IL-1 β) değerleri	49
4.2: Sıçanlarda yapılan temporomandibular eklem artrit (TMEA) modelinde tüm grupların sinoviyal sıvıya ait Tumor Nekrosis Faktör- α (TNF- α), interlökin-1 β (IL-1 β), Matris metaloproteinaz-2 (MMP-2) ve MMP-9 değerleri.	50
4.3: Sıçanlarda yapılan temporomandibular eklem artrit (TMEA) modelinde tüm gruplara ait doku siklooksijenaz-1 (COX-1) ve COX-2 aktiviteleri.	51
4.4: Sıçanlarda yapılan temporomandibular eklem artrit (TMEA) modelinde tüm gruplara ait doku Rapidly Accelerated Fibrosarcoma-1 (Raf-1) ve Signall transducer and activator of transcription3 (STAT3) düzeyleri.	52

1. GİRİŞ

Çiğneme, konuşma ve yutkunma gibi önemli fonksiyonlara katılan temporomandibular eklemin (TME) hastalıkları toplumun her kesimini etkilemektedir (Tüzüm ve Harorlı, 1987; Okeson, 2008, Wang ve diğerleri, 2015). Temporomandibular kaynaklı semptomlar nedeniyle hastalar genellikle bir diş hekimine başvururlar ve bazı sorunları onlar tarafından çözülmeye çalışılır. Bunların dışında TME sorunu olan hastaların birçoğu diğer uzmanlara başvurur veya yönlendirilirler. Fakat bu anlamda disiplinler arasında terminoloji, etyoloji ve tedavi yöntemleri arasında farklılıklar olabilmektedir (Field ve diğerleri, 2008).

Temporomandibular eklemden kaynaklanan semptomlar analiz edildiği zaman bu semptomların başlıca iki kaynağı olduğu görülür. Bunlardan birincisi kaslardan, eklem yapılarından ve anormal fiziksel aktivite sonucu meydana gelir. İkinci kaynak eklemin kendisinden olan patolojik durumlardır ki buna en iyi örnek romatoid artrit (Field ve diğerleri, 2008).

Çene ekleminin hastalıkları içinde iltihapsal olanlar büyük öneme sahiptir. Bunlar sinovit, kapsülit, retrodiskit ve artrit olmak üzere başlıca 4 gruba ayrılır. Artrit, eklemin artiküler yüzeylerinin iltihaplanması anlamına gelmektedir. Temporomandibular eklemi etkileyen çeşitli tiplerde artrit vardır. Bunlardan en fazla görülen osteoartrit, osteoartroz ve poliartrittir. Bunların her birini ifade etmek için “TME İnflamasyonu” terimi kullanılabilir. Bu terim ancak TME palpasyonunda hassasiyet varsa kullanılabilir. Poliartrit sistemik bir durum olup bütün eklemleri etkiler. Bu arada TME’de inflamasyon ve diğer eklemlerde hassasiyet, ağrı ile karakterize romatoid artrit şeklinde kendini gösterir.

Romatoid artrit (RA) vücutta pek çok eklemi tutan sistemik bir bozukluktur. Sinoviyal membranların iltihaplanması ile karakterizedir. Bu iltihaplanma çevredeki bağ dokusu ve artiküler yüzeyleri de tutmakta ve böylece bu yüzeylerin kalınlaşmasına ve hassas hale gelmesine neden olmaktadır. Temporomandibular eklem (TME) tutulumunda genellikle bilateral ağrı, hassasiyet ve şişme, çene hareketlerinde kısıtlılık

görülür. Hastalığın geç döneminde ise ankiloz görülme olasılığı oldukça fazladır (Rivanor ve diğerleri, 2014). Temporomandibular eklem dahil diğer eklemlerdeki sistemik rahatsızlıklar örneğin romatoid artrit medikal ve dental tedaviyi gerektirir.

Günümüzde romatoid artrit tedavisinde, okluzal splint, fizik tedavi, non-steroid anti-inflamatuar ilaçlar (NSAID), artrosentez, artroskopi veya açık cerrahi teknikler uygulanmaktadır.

Bunların dışında pineal indol hormonlardan melatoninin (N-acetyl-5-methoxytryptamine, MEL) RA üzerindeki etkileri araştırılmaktadır. Romatoid artritli hastalarda yapılan çalışmalarda sinoviyal sıvı içerisindeki proinflamatuar hücreler üzerine MEL'in antiinflamatuar ve antioksidan özelliği ile koruyucu etkisi olduğu saptanmıştır (Cutolo ve Maestroni, 2005).

Melatonine benzer diğer bir pineal indol hormon olan 5-metoksitriptofol'un (5-MTX) eklem ve sinovial doku üzerinde benzer etkilerinin olabileceği düşüncesiyle çalışmamızda, sıçanlarda zymosan ile oluşturulan Temporomandibular Eklem Artrit (TMEA) modelinde, MEL ve 5-MTX'in eklem ve sinoviyal dokular üzerindeki etkilerini araştırmak ve birlikte kullanımlarının sinerjistik etkilerinin olup olmadığını incelemek, ileride kliniğe yönelik kullanılıp kullanılmayacağını saptamak amaçlanmıştır.

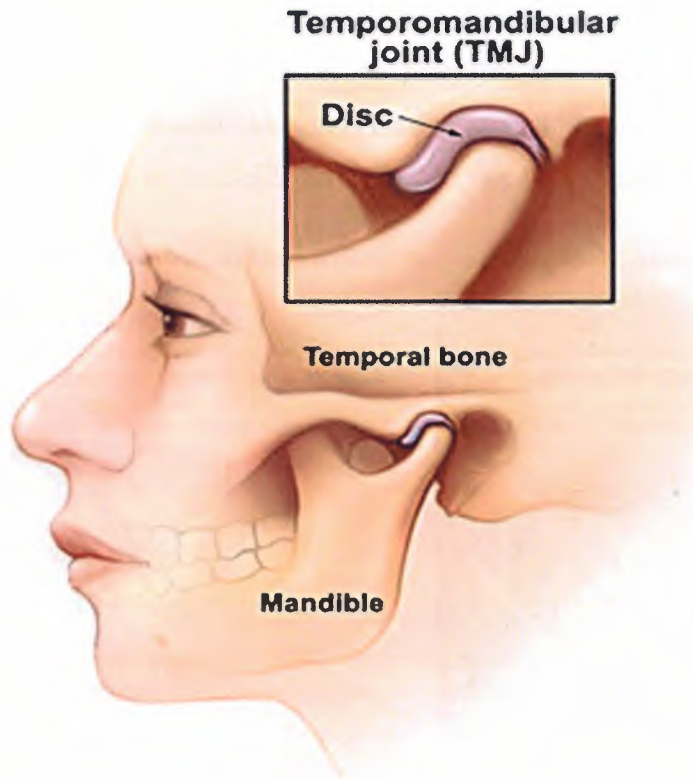
2. GENEL BİLGİLER

2.1 Temporomandibular Eklem (TME) Anatomisi

2.1.1. Mandibular Kondil

Baş boyun bölgesindeki tek hareketli eklem olan bu eklem, mandibular kondilin kaput mandibulası ile temporal kemiğin glenoid fossası ve artiküler eminensi arasında yer alan diartrodial bir eklemdir (Şekil 2.1).

Artiküler eminens, kuvvetlere dayanıklılığı artıran fibrokartilajenöz lamina ile desteklenir. Eklem mandibular kondiler çıkıntısı elips şeklinde olup uzun eksen frontal düzlemle 30 derecelik açı yapacak şekilde mediale ve posteriora yönelir.

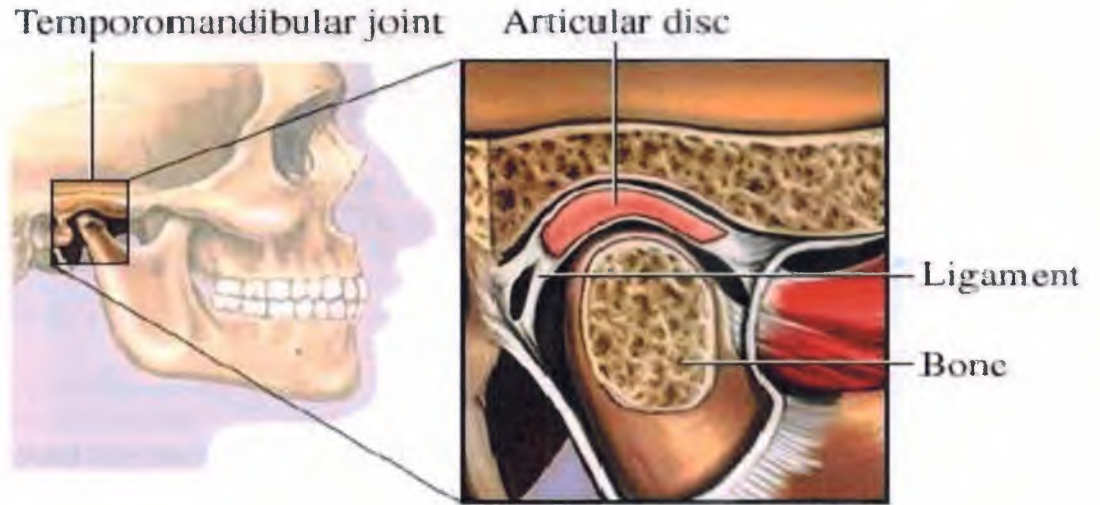


Şekil 2.1: Temporomandibular Eklem (Okeson, 1993)

2.1.2. Artiküler Disk

Eklem yüzeyleri arasında fibrokartilojenöz yapıda bir disk bulunur. Artiküler disk, eklem yüzeylerini ikiye ayırarak eklem kompleks hareketler yapmasını sağlar (Şekil 2.2). Alt disk boşluğu (infradiskal bölüm) rotasyon hareketlerine izin verir bu nedenle ginglimoid ismini alır, üst eklem boşluğu (supradiskal bölüm) ise kayma hareketine izin verir bu nedenle arthrodial ismini alır. Eklem tümüne “ginglimoarthrodial eklem” ismi verilir.

Artiküler disk, kan damarları ve sinirlerden yoksundur. Artiküler disk, mandibular fossa ve kondilin artiküler yüzeyleri yoğun fibröz bağ dokusu ile döşenmiştir. Fibröz bağ dokusu bulunmasının çeşitli avantajları vardır. Yaşa bağlı olarak eklem yıpranmaz ve ayrıca kıkırdığa göre tamir olabilme yeteneği çok fazladır. Bu iki faktör TME fonksiyon ve disfonksiyonunda önem kazanır. Artiküler disk, fonksiyon sırasında geri dönüşümlü olarak esneme özelliğine sahiptir. Böylece, artiküler yüzeylerin birbirleri üzerinde kayabilmeleri için tampon görevi görür. Bu disk, eklem içi yapısal değişimler ve patolojik kuvvetler söz konusu olmadıkça morfolojisini korur. Bunlar olduğunda ise disk morfolojisinde geri dönüşümü olmayan değişiklikler oluşur ve patolojik durumlar ortaya çıkar (Okeson, 2008).

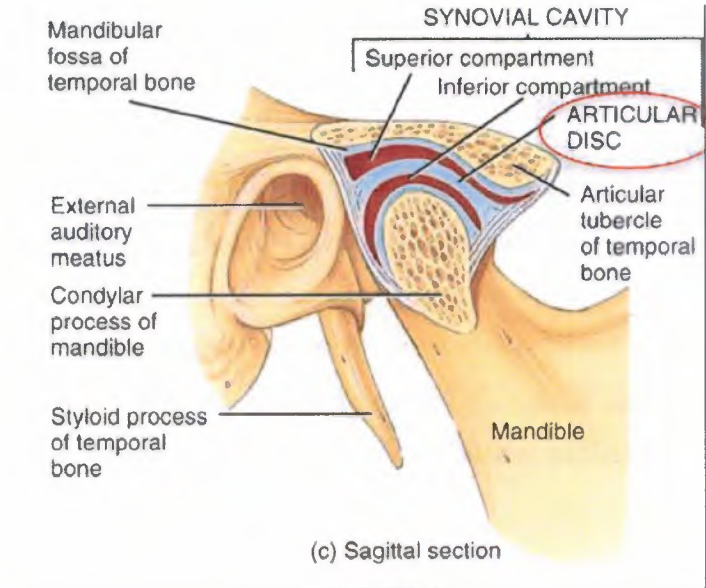


Şekil 2.2: Temporomandibular eklem diski (Nucleus, 2016).

2.1.3. Sinoviyal Dokular

Temporomandibular eklemi oluşturan kemiklerin eklem bakan kısmı ile kapsülün iç yüzü sinoviyal membran ile örtülüdür (Okeson, 2008) (Şekil 2.3). Histolojik olarak, sinoviyal membran bir ile dört katman derinliğinde tunica intima tabakası ve tunica subintima tabakasından oluşur. Sinoviyal sıvıyı oluşturan hücreler birbirleriyle bağlantılı değildir ve bu iki tip hücre RNA içerikleriyle de birbirlerinden farklıdır.

Işık mikroskopunun altında fibroblastlar gibi görünen (sinoviyosit) birinci hücre tipinin, subintimal kollajen, proteoglikanlar ve sinoviyal sıvının glikoproteinlerini salgıladığı düşünülmektedir. Aynı zamanda bu hücrelere B tipi ya da S tipi hücreler de denilmektedir (Herb ve diğerleri, 2006).



Şekil 2.3: Sinoviyal kavite (Miller, 2016)

Büyük miktarda lizozomlar, serbest ribozomlar ve iyi gelişmiş golgi kompleksinden oluşan makrofajlar ise ikinci hücre tipini oluşturmaktadırlar. A tipi ya da M tipi olarak da adlandırılan bu hücreler fagositoz mekanizmasında görevli olan

hücrelerdir. Bu sinoviyal hücrelerin iki tipi de eklem yüzeylerini fibröz adezyonlardan korumak için kollejenaz ve elastaz gibi proteazların salgılanmasından sorumludurlar (Dijkgraaf ve diğerleri, 1996).

Sinoviyal sıvı, eklem artiküler yüzeyleri vasküler olmadığından dolayı bu dokuların beslenmesinde görev yapmaktadır. Artiküler dokular ile sinoviyal sıvı ve kapsülün damarları arasında hızlı ve serbest değişimler olmaktadır. Ayrıca sinoviyal sıvı, fonksiyon süresince artiküler yüzeyler arasında kayganlaştırıcı olarak görev yapmaktadır. Diskin, kondilin ve fossanın artiküler yüzeyleri oldukça düzgündür. Bu durum artiküler yüzeylerin hareket süresince sürtünmesini azaltır. Sinoviyal sıvı da kayganlaştırıcı özelliğiyle sürtünmeyi azaltmakta katkıda bulunur (Bumann ve Lotzmann, 2002).

2.1.4. Ligamentler

Temporomandibular eklem ligamentleri fonksiyonel ve aksesuar ligamentler olarak iki ana gruba ayrılır.

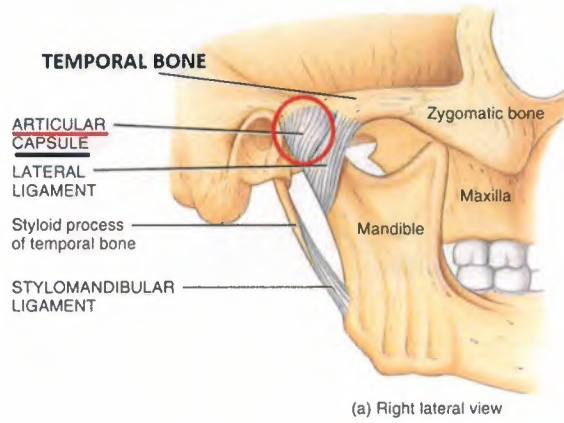
Fonksiyonel ligamentler, kollateral ligament, kapsüler ligament ve temporomandibular ligament olmak üzere üç adettir.

Kollateral (diskal) ligament, medial ve lateral olmak üzere ikiye ayrılır. Görevleri, diskin kondilden bağımsız hareket etmesini engellemektir. Diskin kondille birlikte pasif olarak, öne ya da geriye hareketini sağlarlar, ayrıca eklem rotasyon hareketini sınırlarlar.

Kapsüler ligament, eklem kapsülü olarak da adlandırılmaktadır. Eklem kapsülünün üst kısmı geniş olup önde artiküler tüberküle (eminense) yapışır, arkada ise petrotimpanik fissürü dışarıda bırakacak şekilde, mandibular fossayı çevreler (Şekil 2.4). Kapsülün dar olan alt kısmı ise mandibular kondil boynuna yapışır. Kapsülün arka kısmı daha uzundur ve diğer bölümlerine oranla daha fazla elastik lif içerir. Bu nedenle çenenin açılması esnasında uzayarak mandibular kaputun öne doğru

hareketine ve çenenin kapanması esnasında mandibular kaputun tekrar eski konumuna gelmesine yardımcı olur (Okeson, 2008).

Kapsüler ligament, ön tarafta tendinöz lifler aracılığıyla superior lateral pterigoid kas ile birleşir. Eklem etrafını tamamen sararak sinoviyal sıvıyı korur ve sınırlı miktarda sinoviyal sıvıyı depolayabilir. Fonksiyonel basınç altında, statik ve dinamik yüklere karşı eklem içinde minimal sürtünmeyi sağlamak amacıyla bu sinoviyal sıvı tekrar serbestleştirilebilir. Kapsülün asıl görevi, eklem dislokasyonuna sebep olabilecek medial, lateral veya inferior yönden gelen kuvvetlere karşı koymaktır. İyi inerve olmuştur ve eklem pozisyonları için proprioseptif uyarım sağlar. Eklemde 4 adet proprioseptif reseptör bulunur; **Tip I reseptörler**, postural bilgi sağlar ve antagonist kaslar üzerinde refleksif inhibitör etkileri vardır. **Tip II reseptörler**, hareketler hakkında bilgi sağlar ve değişikliklere hızlı uyum sağlarlar. **Tip III reseptörler**, yavaş adapte olurlar. **Tip IV reseptörler**, duyuşsal ağrı algısı için hazırda beklerler ve normal durumlarda fonksiyonları yoktur (Bumann ve Lotzmann, 2002).

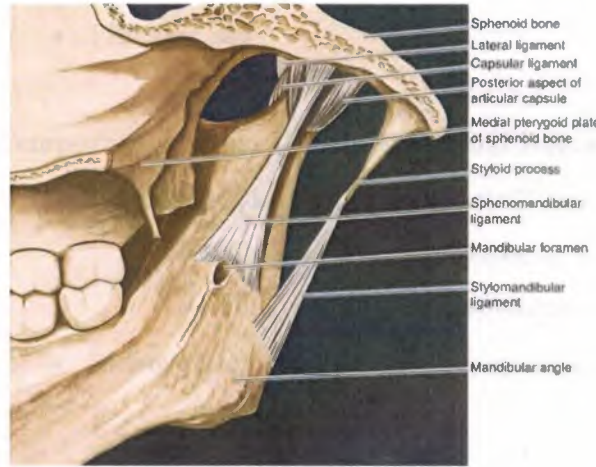


Şekil 2.4: Temporomandibular eklem kapsülü (Okeson, 2008)

Tempromandibular ligament, eklem en önemli ligamentidir. Kapsüler ligamenti lateralden kavrır. Lateral ligament (dış oblik kısım) ve medial ligament (iç oblik kısım) olmak üzere iki bölümden meydana gelir. Lateral ligament, artiküler tüberkülün dış yüzünden ve zigomatik prosesden başlayıp kondilin boyun kısmına

tutunur. Bu kısım ağzın çok fazla açılmasını sınırlar. Medial ligament ise, artiküler tüberkül ve zigomatik prosesden başlayıp arkaya doğru horizontal olarak kondilin lateraline uzanır. Bu kısım, kondil ve diskin posteriora doğru olan hareketlerini sınırlar böylece kondilin geriye doğru giderek retrodiskal dokulara zarar vermesini engeller.

Aksesuar ligamentler ise sfenomandibular ligament ve stylomandibular ligament olmak üzere iki adettir. Sfenomandibular ligament, sfenoid kemikten başlar, aşağıya doğru uzanarak mandibulanın iç yüzeyindeki lingula mandibulaya tutunur. Eklem hareketlerinde belirli bir sınırlayıcı etkisi yoktur. Stylomandibular ligament ise, stiloid prosesden aşağı ve öne uzanarak angulus mandibulaya tutunur. Mandibulanın protrüzyonunda gerginleşir. Bu nedenle mandibulanın aşırı öne gitmesini engeller (Okeson, 2008) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5: Temporomandibular eklem ligamentleri (Traveler, 2012).

2.1.5. Temporomandibular Eklemi İnerve Eden Sinir ve Damarlar

Temporomandibular eklem; nervus mandibularisin dalı olan nervus massetericus ve nervus auriculotemporalis tarafından inerve edilir, arteria temporalis superficialisin ramii articularisi ile arteria maxillarisin arteria auricularis profundasından gelen dallar ile beslenir. Venleri de arterleri ile aynı adı taşır.

2.2. Temporomandibular Eklem Rahatsızlıklarının Sınıflaması

Temporomandibular rahatsızlıklar, American Academy of Orofacial Pain ve International Headache Society tarafından aşağıdaki şekilde sınıflandırılmıştır (Schiffman ve diğerleri, 2014; Okeson, 2008; De Leeuw, 2008).

- **Çiğneme Kasları İle İlgili Bozukluklar**
 - Koruyucu kas kasılması
 - Lokal kas ağrısı
 - Miyofasial ağrı
 - Miyospazm
 - Santral Kaynaklı Miyalji
 - Fibromiyalji
- **Temporomandibular Eklem İnternal Düzensizlikleri**
 - Kondil-disk kompleksi düzensizlikleri
 - Redüksiyonlu Disk Deplasmanı (RDD)
 - Redüksiyonsuz Disk Deplasmanı (RDD)
 - Eklem yüzeylerinin yapısal uyumsuzluğu
 - Şekil değişiklikleri
 - Diskte
 - Kondilde
 - Fossada
 - Adezyonlar
 - Disk-kondil arasında
 - Disk-fossa arasında
 - Subluksasyon (hipermobilite)
 - Spontan dislokasyon

➤ **Temporomandibular Eklemin İnflamatuvar Hastalıkları**

- **Sinovit/kapsülit**
- **Retrodiskit**
- **Artritler**
 - Osteoartrit/Osteoartroz
 - Poliartrit
 - Romatoid Artrit
 - İnfeksiyöz Artrit
 - Travmatik Artrit
 - Psoriatik Artrit
 - Metabolik Artritler
- **İlgili yapıların inflamatuvar hastalıkları**
 - Temporalis tendiniti
 - Stylomandibular ligamentin inflamasyonu

➤ **Kronik mandibular hipomobilité**

- **Ankiloz**
 - Fibröz
 - Kemiksel
- **Kas kontraktürleri**
 - Miyostatik
 - Miyofibrotik
- **Koronoid engelleme**

➤ **Gelişim bozuklukları**

- **Konjenital ve gelişimsel kemik rahatsızlıkları**
 - Agenezi
 - Hipoplazi
 - Hiperplazi
 - Neoplazi

- **Konjenital ve gelişimsel kas rahatsızlıkları**

- Hipotrofi
- Hipertrofi
- Neoplazi

2.2.1. Artritler

2.2.1.1. Osteoartrit/Osteoartroz

Temporomandibular eklemin en yaygın artrit tipi osteoartrittir (dejeneratif artrit). Genel populasyonun %16'sında klinik semptom görülürken populasyonun %44'ünde asemptomatiktir ve radyografik olarak teşhis edilir. Temporomandibular eklem ağırlık taşıyabilen bir eklem değildir, ancak parafonksiyonel aktiviteler sırasındaki stres TME'de osteoartrite benzer şekilde dejenerasyonların olmasına neden olabilmektedir. Primer osteoartrit genellikle yaşlı hastalarda görülür. Hafif bir rahatsızlık hissi olup, nadir olarak şikayet yaratır. Sekonder osteoartrit ise 20 ile 40 yaşlar arasında olabilmektedir ve şiddetli derecede ağrılıdır. En sık nedeni akut veya kronik travma ve internal düzensizliklerdir (Poswillo, 1970).

Osteoartrit, kartilajın dejenerasyonu sonucu ortaya çıkar. Buna bağlı olarak kartilajın yıkım ürünleri ve inflamatuvar mediatörler nedeniyle sinoviyal inflamasyon (sinovit) meydana gelir. Fonksiyonlar ile artan TME ağrısı, eklemde gerginlik, ağız açılımında kısıtlılık, sıklıkla klik veya popping işitilir. Daha ileri evrelerde krepitasyon duyulur (Laskin, 2001). Radyografik olarak subkondral kemikte artritik değişiklikler, eklem aralığında daralma görülür. Manyetik rezonans görüntülemeye deplase ve deforme disk saptanır. Osteoartroz ise osteoartrit gibi dejeneratif bir durumdur ancak tedaviye gerek duyulmayabilir (Okeson, 2008).

Osteoartritin tedavisinde öncelikle eklemde aşırı yüklenmeye sebep olan okluzal düzensizliklerin giderilmesi sağlanmalıdır. Bununla birlikte kas egzersizleri ve psikolojik destek tedavisi bazı hastalarda gerekebilir. Bruksizm gibi psikolojik problemlerin eşlik ettiği eklemde aşırı yüklenmeye sebep olan durumlarda, gece plağı

kullanımı, eklem gelen yükü ve kas kontraksiyonunu azaltır. Bu konservatif yöntemlerin sonuçsuz kaldığı durumlarda veya tedaviye cevabın geç olduğu ve subkondral kemik tabakasında radyolojik bulguların görüldüğü ilerlemiş osteoartrit olgularında eklem içi adrenokortikal steroidler uygulanabilir. Temporomandibular eklem ağrılı iltihabi durumlarında kortikosteroidlerin üst eklem boşluğuna dikkatli bir şekilde enjeksiyonu, birçok hasta için semptomlarda azalma ihtimali yüksek, komplikasyon oranı ise düşük olan mantıklı ve güvenilir bir tedavi yöntemidir (Wang ve diğerleri, 2015).

2.2.1.2. Poliartrit

Birden fazla eklemi etkileyen bir durumdur. Teşhis edildiği zaman tedavisi artrit tedavisiyle aynıdır (Atsu ve Ayhan-Ardic, 2006).

2.2.1.3. Romatoid Artrit

Romatoid artrit değişken ancak kimi zaman belirgin derecede ekstraartiküler tutulumun eşlik ettiği, eroziv, simetrik eklem hastalığının odak oluşturduğu kronik, sistemik, otoimmün ve inflamatuvar bir hastalıktır.

Temporomandibular ekleminde görülen romatoid artrit genellikle bilateral ağrı, hassasiyet ve şişme, çene hareketlerinde kısıtlılık belirgin özelliklerdir. Erken evrede radyolojik bulgu olmayabilir fakat ilerleyen dönemlerde, kondilin artiküler yüzeyinin dejenere olduğu ve eklem boşluğunun daraldığı görülür. Anterior açık kapanış görülebilir. Çocuk hastalarda bahsedilen dejenerasyon mandibulada gelişim geriliğine ve fasiyal deformiteye yol açabilir. Yetişkinlerde, eklem sertleşmesinden okluzal fasiyal deformitelere kadar çeşitlilik gösterir. Tüm hastalarda ankiloz olabilme ihtimali yüksektir (Celiker ve diğerleri, 1995) .

• Epidemiyoloji ve Etyoloji

Dünya çapında genel olarak RA'nın prevalansı % 1 olarak bildirilmiştir. Kadınlarda erkeklerden 2-3 kat daha fazla görülür. Her yaşta görülebilsede hastalığın başlangıcı en sık 40-60 yaşları arasındadır (Akkoç ve Akar, 2006) .

Romatoid artrit etyolojisi tam olarak bilinmemektedir. Tek başına veya multifaktöryel olarak bir çok etken bu hastalığın oluşmasına neden olabilmektedir. Otoimmün nedenler, sigara, genetik, mikrobiyal kaynaklı enfeksiyonlar gibi faktörler RA insidansını artırabilmektedir (Kınıklı, 1995).

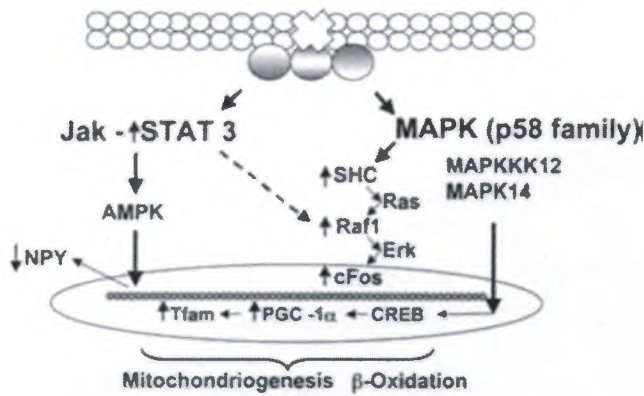
• Histopatoloji ve Biyokimya

Romatoid artritlen etkilenen eklemlerde dejeneratif değişiklikler görülür. Romatoid artritte, sinoviyal sıvıda inflamatuvar hücreler mevcuttur. Romatoid artritte sinoviyal dokulara makrofaj, granulosit ve plazma hücreleri infiltrat olur (Seymour *et al*, 1985). Bu durumda sinoviyum kalınlaşır ve “pannus” olarak adlandırılır. Pannus, inflamatuvar sinoviyal doku kitlesinin kıkırdağa, kemiğe ve tendonlara invazyonu sonucu oluşan hasardır. Pannus eklem boşluğuna doğru büyür ve çıkıntılı katlantılar oluşturur. Bu durum eklem fonksiyonlarını bozarak ve yumuşak dokuların gerilmesine neden olarak ağrı oluşturur (Strand ve Kavanaugh, 2004). Sinoviyumda granulosit ve makrofajlardan salınan lizozomal enzimler kondil başı ve temporal kemikte yıkım ve erozyona neden olurlar. Bu dejeneratif değişikliklerle eklem fonksiyonlarının bozulması, fibröz ve kemik ankilozları, okluzal-fasiyal deformiteler ve okluzal uyumsuzluklar ortaya çıkabilir (Dayer, 2004).

İnflamatuvar hücrelerden aşırı miktarda açığa çıkan inflamatuvar mediyatörler eklem yıkımına neden olur. TNF- α ve IL-1 β gibi mediyatörler artrit patogenezi ile ilişkili olup sinoviyumun stromal hücrelerinde matriks metallopeptidaz-2 (MMP-2) ve matriks metallopeptidaz-9 (MMP-9) gibi proteolitik enzimlerin sekresyonunda artışa neden olmaktadır (Ed, 1990; Nielsen *et al*, 2008). Bu enzimler, ekstraselüler matriks proteinlerinin spesifik peptid bağlarını degrade ederek inflamatuvar hücrelerin

ekspresyonunu sağlamaktadır.

Romatoid artrit patogeneğinde intraselüler iletide rol alan stres kinaz (*Mitogen Activated Protein Kinase, MAPK*) yolağı ile birlikte *Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3)* yolağı da katkıda bulunmaktadır. Bu yollar sonucunda oluşan ara ürünler oksidasyonda, apoptozda ve farklılaşmada rol oynamaktadır (Şekil 2.6)

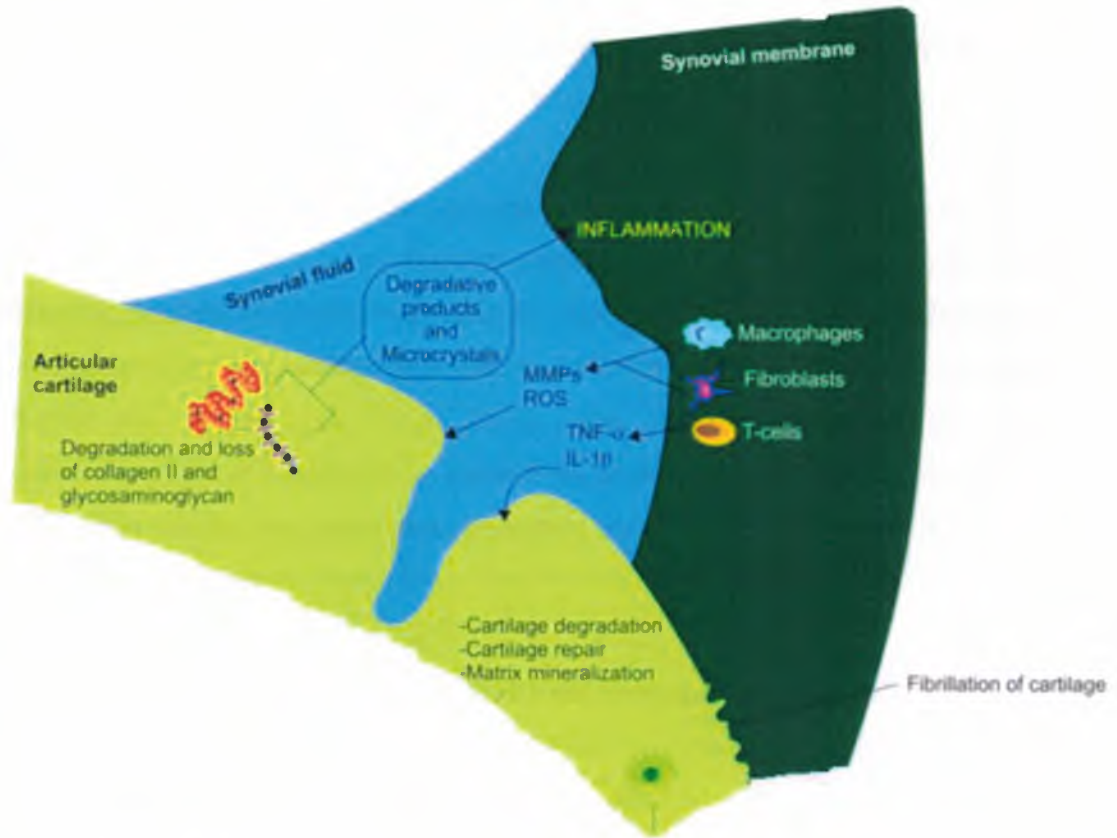


Şekil 2.6: Romatoid artritte rol oynayan “Mitogen Activated Protein Kinases ve Signal Transducer and Activator of Transcription 3” yolları (Tchaparian ve diğerleri, 2010). *Janus Kinase (JAK)/Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT)*, *Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK)*, *AMP-Activated Protein Kinase (AMPK)*, *Neuropeptide Y (NPY)*, *transcription factor A (Tfam)*, *Peroxisome-Proliferator-Activated Receptor γ Coactivator-1 α (PGC-1 α)*, *Cystic Fibrosis Gene (CREB)*, *MAPK kinase kinase (MAPKKK)*, *Src homology 2 domain containing transforming protein 1 (SHC)*, *extracellular signal-regulated kinases (ERK)*, *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma-1 (Raf-1)*.

Siklooksijenaz (COX), araşidonik asitin prostoglandine dönüşümünü katalize eden çok işlevli bir enzimdir. Siklooksijenaz, enziminin iki izoformu tanımlanmıştır. Siklooksijenaz-1 (COX-1), birçok hücrede yapısal olarak açığa çıkmaktadır. Sinoviyal

dokularda, özellikle sinoviyal sınır katmanında, COX-1 bulunmakta ve doku inflamasyonu gerçekleşse bile seviyesinde herhangi bir farklılık görülmemektedir. Diğer taraftan, normal koşullar altında COX-2 salınımı son derece azdır ancak inflamasyon sırasında salınımı yükselir. Yapılan hem klinik hem deneysel çalışmalarda RA'da, COX-2 artışı olduğu gösterilmiştir (Siegle ve diğerleri, 1998, Hanafy ve diğerleri, 2012; Malda ve diğerleri, 2016) (Şekil 2.7).

Romatoid artrit, eklem bölgesinde damar endotel hücrelerinin lokalizasyonu, mononükleer inflamatuvar hücreler ve fibroblast benzeri hücrelerin (sinoviositler) infiltrasyonu gözlenmiştir (Sano ve diğerleri, 1992).



Şekil 2.7: Romatoid artrit yol açan proinflamatuvar mediatörler (Mobasheri ve diğerleri, 2012). Matrix Metalloproteinazlar (MMPs), Reaktif Oksijen Türleri (ROS), Tümör Nekrozis Faktör- α (TNF- α), Interlökin-1 β (IL-1 β).

• Genel Klinik Bulgular

Romatoid artrit TME tutulumu olduğu gibi diğer eklemlerde de tutulumu gözlemlenir. El eklemleri, dirsekler, el bileği, ayak bileği, ayak, kalça, diz ve TME'nin simetrik olarak tutulumu RA için karakteristiktir (Hochberg ve diğerleri, 1992). Romatoid artrit sinsi bir hastalık olup başlangıçta kolay teşhis edilemeyebilmektedir. Eklem bölgelerinde erken safhada radyolojik görüntü vermeyip klinik bulgular sayesinde erken teşhis konulabilmektedir. Erken klinik bulguları; kilo kaybı, yorgunluk hissi ve ateştir. Artiküler semptomları; eklem ağrısı, sabah görülen 30 dakikadan fazla süren eklem sertliği, eklemlerde şişme ve fonksiyon kaybı, tendon rüptürü ve kas ağrılarıdır. Eklemlerdeki ilerleyen dejeneratif değişiklikler nedeniyle, parmaklarda kuğu boynu deformitesi gibi karakteristik eklem deformitelerine neden olur. Servikal omur da etkilenebilir (Macovei ve Rezuş, 2016).

Romatoid artrit eklemler dışındaki sistemik bulguları; subkutan nodüller, osteoporoz, plevral efüzyon (sıvı birikimi), asemptomatik perikardit, anemi, Reynaud fenomeni, periferik nörolojik semptomlardır. Romatoid artrit hastalarının birçoğunda romatoid nodüller bulunabilmektedir. Bu nodüller en çok dirsek, parmak eklemleri, oksipital deri bölgesi gibi basınç altında olan yerlerde görülebilir. Romatoid granülomlar miyokard, parankim ve sklerada bulunabilir. Romatoid artrit hastalarının % 80'i uzun periyotta remisyona girer. Romatoid artrit, % 5 oranda Sjögren Sendromu ile birlikte görülebilir.

• Romatoid Artrit Klinik Bulguları

1874'de Garrod tarafından ilk defa romatoid artrit TME tutulumu bildirilmiştir. Temporomandibular eklem tek taraflı tutulumu olabileceği gibi simetrik tutulumu da olabilmektedir (Kent ve diğerleri, 1986). En sık görülen klinik belirti fonksiyon sırasında derin preaurikular ağrıdır. Eklemler palpasyona hassastır ve sabah saatlerinde eklem sertliği de mevcuttur. Klik, krepitasyon ve ısırma kuvvetinde azalma vardır (Atsü ve Ayhan-ardıç, 2006). Moen ve diğerleri (2005) RA hastalarının % 77'sinde TME'de ağrı ve disfonksiyon olduğunu rapor etmişlerdir. En sık görülen

deformite anterior açık kapanıştır. Lin ve diğerleri (2007) ise 56 RA hastası ile yaptıkları çalışmalarında hastaların 3'ünde anterior açık kapanışla birlikte fibröz ve kemik ankilozunun da eşlik ettiğini belirtmişlerdir.

• Romatoid Artrit Tedavisi

Artrit tedavisinde hedef, hastalığı kontrol altına almak ve TME'deki RA ilerleyişini önlemektir. Hastalığın kontrol altına alınması ve ilerlemesini önlemek için farmakolojik girişimler (lokal veya sistemik), fizik tedavi, oral apareyler, kombine tedaviler uygulanıp cerrahi girişimler yapılmaktadır (Hamuryudan, 2007).

➤ Farmakolojik Tedavi

Romatoid artrit tedavinin temel amacı, ağrıyı dindirmek, eklem harabiyetini ve diğer komplikasyonları önleyerek hastaların günlük aktivitelerini düzenli bir şekilde sürdürmelerini sağlamaktır. Bu amaçlara ulaşmada ilaç tedavisi ile birlikte hasta eğitimi ve bir çok tıp dalı arasında işbirliği şarttır. Bu koşulların zor sağlandığı az gelişmiş ülkelerde ise sonuç, hastalar açısından genellikle hayal kırıcı olmaktadır.

Romatoid artrit tedavisinde kullanılan ilaçların hiç biri - yeni geliştirilenler de dahil olmak üzere - hastalığı tamamen ortadan kaldıramamaktadırlar. Yine de son yıllarda romatoid artrit tedavisinde çok olumlu değişiklikler olmuştur. Bunlar, hastalığın erken tanı ve tedavisinin uzun vadedeki prognoza olumlu katkısı, özellikle erken hastalıkta ilaçların kombine kullanılmasının tek tek kullanılmasından daha etkili olduklarının gösterilmesi ve biyolojik etkili ilaçların kullanıma girmesidir.

Romatoid artrit tedavisinde kullanılan ilaçları, nonsteroid anti-inflamatuar ilaçlar, kortizon ve hastalığın seyrini değiştiren ilaçlar (DMARD'lar) olarak özetlemek mümkündür.

❖ Nonsteroidal Anti-İnflamatuar İlaçlar (NSAİD)

Nonsteroidal Anti-İnflamatuar İlaçlar (Aspirin, Naproksen Sodyum, İbuprofen,.. vb) eklem ağrısı ve sabah sertliğini gidermede oldukça etkilidirler ancak hastalığın ilerlemesinin önlenmesi ve eklem dejenerasyonu üzerinde etkileri yoktur. Etki bakımından aralarında büyük bir fark olmayan bu ilaçların seçimlerinde yarılanma süreleri, gastrointestinal sistem başta olmak üzere çeşitli yan etkiler ile birlikte hasta uyuncu ve ilaçların maliyeti önemli rol oynamaktadır.

❖ Kortikosteroidler (Glukokortikoidler)

Romatoid artrit eklem bulguları düşük doz kortikosteroide iyi yanıt verirse de ilacın dozu ve kullanıldığı süreye bağlı olarak gelişen yan etkiler kortikosteroid kullanımını kısıtlar. Yine de düşük doz prednizolon, böbrek – gastrointestinal sistem, kalp gibi eşlik eden hastalığı olanlarda, yaşlılarda ve gebelerde çoğu zaman tercih edilen ilaç olmaktadır. Düşük doz prednizolon erozyon gelişmesini geciktirmektedir. Organ tutulumlarında tutulumun önemine ve şiddetine bağlı olarak daha yüksek dozlarda kortikosteroid gerekebilmektedir. Hastalığın akut dönemlerinde kısa süreli intravenöz ve tek tek eklemlere yönelik lokal kortikosteroid uygulamaları da yapılmaktadır. Lokal uygulamaların amacı ağrının azaltılması, eklem hareketliliğinin artırılması ve inflamasyonun azaltılmasıdır. Lokal uygulamalarda inflamasyonu azaltmak için 0.5-mL veya 1-mL *triamcinolone acetonide* (40 mg/mL) ve *triamcinolone hexacetonide* (5-20 mg/mL) intraartiküler uygulamalarda kullanılmaktadır. Enjekte edilecek kortikosteroidin hacmi enjeksiyonda karşılaşılan direnç miktarına göre hekimin kararı ya da hastanın ağırlığı ile belirlenir. İntraartiküler enjeksiyon sayısı 1 ile 6 arasında değişebilmektedir. Kortikosteroid enjeksiyonlarının dezavantajları; geçici postoperatif ağrı, enjeksiyon yerinde subkutan atrofi, lipoatrofi, postoperatif 1. günden 2 haftaya kadar süren yüzde şişlik ve ateş, enjeksiyon yerinde cilt hipopigmentasyonu ve skar formasyonu oluşmasıdır (Veldhuis ve diğerleri, 2014).

❖ Hastalığın Seyrini Değiştiren İlaçlar (DMARD'lar)

Hastalığın seyrini değiştirerek erozyon gelişimini durdurduğu veya geciktirdiği kabul edilen sitotoksik ilaçlardır. Bütün romatoid artritli hastalarda tanı konduktan sonra gecikmeden başlanılmalıdır. Metotreksat, sulfasalazin, leflunomid ve hidroksiklorokin bu grupta en çok kullanılan ilaçlardır (Kwoh ve diğerleri, 2002).

✓ Metotreksat

Günümüzde romatoid artrit tedavisinde en yaygın kullanılan ve genellikle ilk başlanan ilaçtır. Bir folik asit antagonistidir. Erozyon gelişmesini yavaşlatır ancak tam iyileşme sağlaması nadirdir. Metotreksat, haftada tek gün ve tercihen tek doz olarak kullanılır.

Metotreksat ile birlikte folik asit (günde 1 – 3 mg) kullanıldığında yan etkilerde azalma görülmektedir. Metotreksatın yan etkilerini folat eksikliğine ait olanlar (bulantı, kusma, oral ülserler ve kemik iliği baskılanması), allerjik olanlar (akciğer toksisitesi) olarak özetlemek mümkündür.

✓ Sulfasalazin

Erozyon gelişimini yavaşlatır. Günlük ortalama dozu 2 gr'dır. Etkisinin başlaması ortalama 2 aydır. Kombinasyon tedavilerinde sıklıkla yer almaktadır ancak metotreksat ile birlikte kullanımı tek kullanımından daha etkili değildir.

✓ Hidroksiklorokin

İyi tolere edilen fakat tek başına kullanıldığında etkisi az olan bir ilaçtır. Erozyon gelişimi üzerine etkisi gösterilmemiştir. En çok metotreksat ile kombine kullanılmaktadır. En korkulan komplikasyonu olan makula toksisitesi, kilogram başına 6.5 mg üstüne çıkılmadıkça nadirdir. İlacın bu yan etkisi nedeni ile hastalar yılda bir kez görme alanını da içeren oftalmolojik bir muayeneden geçirilmelidirler. Yaşlı hastalar ile önceden bir göz problemi bulunanlar dışında tedavi öncesi göz muayenesi gereksizdir.

✓ Leflunomid

Klinik çalışmalarda metotreksat ve sulfasalazin eşit etkili bulunmuştur ayrıca metotreksat ile kombine kullanımının da etkili olduğunu bildiren çalışmalar vardır. Hepatotoksisite en önemli yan etkisidir ve kullanımı süresince düzenli transaminaz kontrolü yapılmalıdır. Bunun yanında diyare, karın ağrısı, döküntü, zayıflama, tansiyon yükselmesi görülebilir.

✓ Siklosporin A

Diğer ilaçlara yanıt vermeyen hastalarda veya metotreksat ile kombine olarak kullanılır. Renal toksisite en önemli yan etkisidir, düzenli kreatinin ve tansiyon kontrolleri gerektirir. Nonsteroidler başta olmak üzere birçok ilaçla etkileştiği unutulmamalıdır.

✓ Biyolojik Ajanlar

Romatoid artrit tedavisinde bu ilaçların kullanıma girmesi ile yeni bir dönem başlamıştır. Günümüzde TNF- α 'ya karşı etanercept, infliksimab ve adalimumab, IL-1'e karşı geliştirilmiş anakinra, anti CD20 pozitif B hücrelerini baskılayan rituximab ve ko-stimülatör molekülleri inhibe ederek T hücre aktivasyonunu baskılayan abatecept lisans alarak kullanıma girmiştir.

TNF- α İnhibitörleri, romatoid artritin belirti ve bulgularını geriletmekte, erozyon gelişimini durdurarak yapısal hasarın ilerlemesini önlemekte ve fiziksel fonksiyonu iyileştirmede etkilidirler. Bu ilaçların metotreksat ile kombinasyonları tek başlarına kullanımlarından daha üstündür.

Etanercept, solübl TNF reseptör füzyon proteinidir. Kontrollü bir çalışmada metotreksat ile birlikte kullanıldığında tek başına metotreksat alanlara göre oldukça anlamlı oranda etkili olduğu belirtilmiştir.

İnfliksimab ve Adalimumab, anti TNF antikorudur. İntravenöz infüzyon şeklinde uygulanır. İlaça karşı antikor gelişimini engellemek amacı ile romatoid artritte metotreksat ile birlikte kullanılmaktadır.

Bu ilaçların giderek daha yaygın kullanılır olmaları ile çeşitli yan etkiler de dikkati çekmeye başlamıştır. Bunların başında infeksiyonlar, lenfoma gelişimi, allerjik reaksiyonlar, multipl skleroz benzeri demiyelinizan hastalık, vaskülit gelişimi ve lupus benzeri otoimmün hastalık gelişimi gelmektedir.

✓ Tedavi Süresi

Hastalığın seyrini değiştiren bir ilaç 3 ay içinde maksimum doza rağmen hastalık kontrol altına alınamıyor ise yeni bir ilaca geçilmeli veya kombinasyon yapılmalıdır. Eğer ilacın etkili olduğu düşünülüyorsa uygun dozda tedavi sürdürülmeli ve olası yan etkiler açısından kontrollere devam edilmelidir. Bu ilaçların etkili olmadığı durumlarda lokal tedavilere geçilmesi gerekmektedir.

➤ Non-invaziv Teknikler

❖ Fizik Tedavi

Fizik tedavi oral apareyler, cerrahi tedavi ya da bunların bir kombinasyonu şeklindedir. Deksmetazon iyontoforez (IP) noninvazif fizyoterapi yöntemidir ki her uygulamada her ekleme 6 mg deksmetazonun transdermal olarak uygulanmasını sağlar. Düşük dereceli elektrik akımları, hidrofilik ilaçların iyonlarına ayrılmasını sağlamaktadır böylece ilaçlar daha derin dokulara penetre olabilmektedir. Deksmetazon yan etkileri; geçici ağrılı olmayan bölgesel eritem, deksmetazon uygulama sırasında metalik tat ve küçük bir deri kabarcığı şeklindedir. 3 ila 6 seans IP uygulaması tavsiye edilir (Veldhuis ve diğerleri, 2014).

❖ Okluzal Splint

Okluzal splint tedavisinin TME osteoartritli hastalar üzerinde olumlu bir etkisi olduğu söylenir. Romatoid artritinin aktif döneminde splint kullanımı ekleme gelen kuvvetsel yükün azaltılmasını ve fonksiyonun geliştirilmesinde yardımcı olmaktadır. Yapılan bir çalışmada, RA hastalarında uzun süreli ortodontik tedavi ile kombin

kullanımında tedaviye yardımcı olduğu saptanmıştır (Kuroda ve diğerleri, 2012).

➤ İnvaziv Teknikler

❖ Artrosentez ve Artroskopi

Artrosentez, terapötik madde ile ortak kullanıldığında inflamasyon sürecini kısaltır, inflamatuvar eksüda drenajını sağlar, adezyonları ayırır, diski serbestleştirir, ağrıyı dindirir ve eklem hareketliliğini sağlar. Artrosentez, ağız sonuna kadar açık ve mandibular kondil çıkıntısı belli iken yapılmalıdır (De Riu ve diğerleri, 2013). Normal maksimum ağız açıklığı ve işleyişini geri getirebilmek için iki iğne eklem alanını delerek kullanılır. Bu teknik, prosedürü geliştirmedeki zorluklar nedeniyle yerini tek iğne artrosentez tekniği almıştır (Singh ve Varghese, 2013). Yapılan çalışmalarda, tek iğne tekniğiyle artrosentez uygulamalarında ağrının azaldığı ve fonksiyonel kaybın geri geldiği saptanmıştır (Vos ve diğerleri, 2014).

Artroskopi, irigasyon yapmak, tanı koymak, eklem dokularının görüntüsünü elde etmek, biyopsi almak ve yapışıklıkları kaldırmak için 1.7 ve 2.7 mm arasında çapa sahip katı optik fiber ile gerçekleştirilir. Ancak literatürde artroskopi ile tedavi çok olmasa bile yapılan çalışmalarda inflamatuvar mediatörleri ortamdan uzaklaştırmasıyla kısa dönemde ağrıyı azalttığı ancak komplikasyon varlığında hastaya ızdırap verdiği ve uzun dönemde eklemde daha yıkıcı bir sonuç verdiği saptanmıştır (Gynther ve Holmlund, 1998).

❖ Açık Cerrahi Teknikler

Diskin tamiri olamayacak şekilde hasara uğraması sonucu diskektomi uygulanmaktadır. Kondil başı rezeksiyonu ise mobilizasyonun geri kazanılmasını ve ağrının dindirilmesini sağlamaktadır. Ancak dokuya yapılan bu rezeksiyon rezorpsiyonu artırarak kondil yüksekliğini negatif yönde etkileyebilmektedir (Sidebottom ve Salha, 2013).

❖ Total Eklem Protez Uygulamaları

Mandibular kondil yoğun hasar gördüğünde, dejenere olduğunda veya kemik kaybında, otojen greft veya alloplastik implant kullanımı fonksiyonel ve semptomatik iyileşme sağlamak için kabul edilebilir bir yaklaşımdır. Total eklem tedavisinden önce yapılan tüm tedavilere rağmen tedavi edilemiyorsa, tüm dejenerasyon, ankiloz ve yıkılmış eklemler için son tedavi total eklem protez uygulamalarıdır. Eklemdeki bu yıkım dengesiz bir okluzyona neden olmakta ve fonksiyon kaybı, ağız açıklığında kısıtlılık ve ağrıya neden olmaktadır.

Total eklem protezleri, 19. yüzyılda geliştirilmiş ve 60'lı yıllarda Christensen tarafından üretilen mevcut protezlerle modifiye edilmiştir. Christensen protezi olan metal-metal kobalt-krom alaşımı yerine (1999 yılına kadar kullanılan) kobalt-krom üzerine akrilik protezler üretilmiş fakat % 10 civarında olası materyal alerjisi nedeniyle yabancı cisim reaksiyonu meydana gelmiştir (Saeed ve diğerleri, 2001).

TMJ Concepts kişiye özel protezler *Computer-Aided Design and Manufacture* (CAD-CAM) cihazları kullanılarak üç boyutlu bilgisayarlı tomografi ile taranarak yapılmaktadır. 17 yıldır %90 oranında başarı elde edilmiştir (Mercuri ve diğerleri, 2007). Kişiye özel eklem protezleri, yüksek molekül ağırlıklı polietilen ve kobalt-krom alaşımından yapılır ve hastalar için hastanede yatış süresi 2 gün olup total diz eklem rekonstrüksiyonu ile benzerlik gösterir. Bu protezler, kafatasının altına ve ramus mandibulaya fikse edilmek suretiyle uygulanır. Total eklem proteziyle okluzyon hemen düzelir, ağız açıklığı 1 ay içerisinde gelişir ve 1 yıl içerisinde ise hastanın beslenmesi düzelir (Sidebottom ve Salha, 2013).

Total eklem rekonstrüksiyonu eklem tedavisinde son aşamadır. Bu tedavi çok agresif olup RA gibi eroziv ve dejeneratif eklem hastalığında mecburi bir tedavi seçeneğidir (Mercuri, 2016).

2.2.1.4. İnfeksiyöz artrit

İnfeksiyöz artrit görülme olasılığı antibiyotiklerin gelişimiyle çok düşmüştür. Eklem içine eksojen olarak giren patojenik bakteri nedeniyle infeksiyöz artrit meydana gelebilmektedir. Genellikle enfeksiyonlardan sorumlu stafilokok ve streptokok mikroorganizmalardır. Patojenlerin dokuya penetrasyonu; enfekte diş, periostitis, infratemporal fossa ya da parotis enfeksiyonları, mandibulanın osteomyelitinden kaynaklı olabilmektedir. Sifiliz, tüberküloz, pnömoni, kızıl gibi hastalıkların seyri sırasında ortaya çıkabilir.

Başlangıçta radyolojik bulgu vermeyebilir, fakat ilerleyen dönemde aşırı kemik destrüksiyonu görülebilir. Hastada hareketle artan ağrı vardır. Eklemde şişlik ve ısı artışı görülür.

İnfeksiyöz artrit tanısında geç kalınmamalıdır. Antibiyotikler, antiinflamatuvar ajanlar ve eklem üzerine gelen yükün azaltılması için istirahat önerilmektedir. Süpüratif enfeksiyonlarda drenaj yapılmaktadır. İleri durumlarda kemik sekestrasyonlarının çıkarılması için cerrahi müdahale gerekebilmektedir (Okeson, 2008)

2.2.1.5. Travmatik artrit

Çenenin dislokasyonu, kırılması gibi sonuçlar doğuran travmalar iltihaplanma için yeterli olabilirler. Travma sonucunda intraartiküler yumuşak dokularda sıkışma olur, eklem damar bakımından zengin olan posterior yüzü ve diskin periferi bu sıkışmaya kanama ile cevap verir ve sonuçta ani bir iltihabi reaksiyon ortaya çıkar. Geçirgenliğin artması sonucu ödem meydana gelir. Ödem, kanama ve yumuşak dokunun kalınlığının artması disk ve kondilin yer değiştirmesine neden olur.

Hastada hareket ile artan ağrı vardır. Ağrı sebebiyle ağız açmakta zorlanma olur. Şişlik varsa akut malokluzyon ortaya çıkar. Hareket kısıtlılığı, deviasyon ve ağrı gibi karakteristik bulgular birkaç günde geçer. Bu sebeple kalıcı ve geriye dönüşü

olmayan restorasyon ve tedavilerden kaçınarak bir süre beklemekte yarar vardır (Okeson, 2008).

2.2.1.6. Psoriatik artrit

Çok uzun zaman kutanöz psorise sahip olan bireylerde çok ender TME tutulumu vardır. Çoğunlukla sadece TME tutulumu olur. Temporomandibular eklemdede ağrı, hareketlerde kısıtlanma, krepitus ve az da olsa RA benzeri bulgular mevcuttur. Radyografik bulgusu yoktur ancak intraartiküler ödem veya kanama olduğunda ya/ya da interkapsüler kırık meydana geldiğinde radyografik bulgu verir (Okeson, 2008)

2.2.1.7. Metabolik Artritler

Hiperüremi (gut-gout), en fazla ayak başparmağında görülmekle birlikte TME'de görülebilir. Daha çok yaşlı kişilerde görülür. Kan testleri veya eklemden aspire edilen materyalde ürik asit kristalleri gösterilerek tanı doğrulanır.

Psodöhiperüremi (psodögut-pseudogout), hiperüremi bulguları ile benzerlik gösterir. Mandibular kondilde dejeneratif ve eroziv değişiklikler gözlenebilmektedir. Yaşlı (primer form) ve gençlerde (sekonder form) görülebilir. İntraartiküler kalsifikasyon ve diskte diffüz kalsifikasyon görülebilir (Türker ve Yücetaş, 1997).

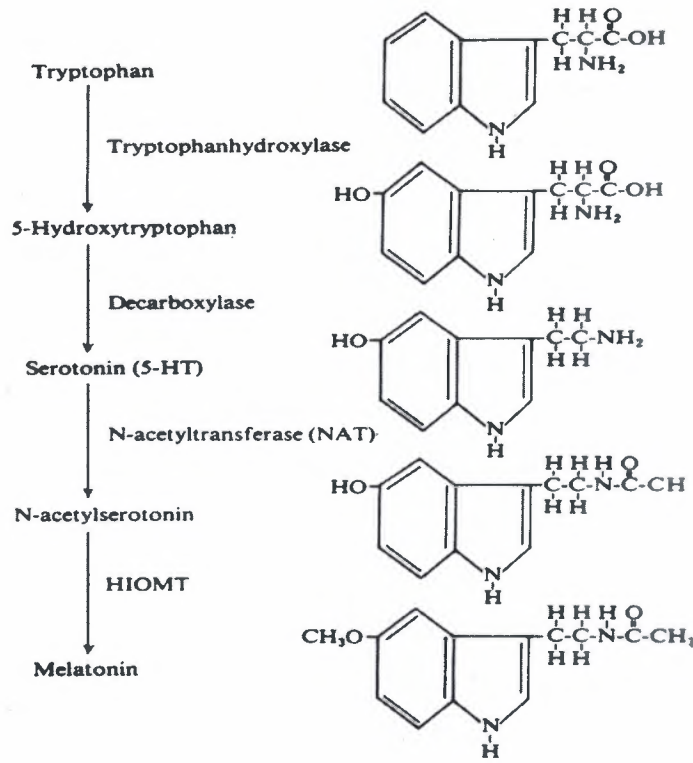
2.3. Melatonin (MEL)

İlk olarak 1958'de, 250.000 sığır pineal bezinden birkaç mg indolamin çıkarılmıştır ve çıkarılan bu moleküle melatonin (N-acetyl-5-methoksitriptamin) ismi verilmiştir (Lerner ve diğerleri, 1958). Melatonin, serotoninin bir metoksi türevi olması ve amfibialarda, epidermal melanositlerden melanin dağılımı üzerinde düzenleyici etkisinden dolayı adı melatonin olmuştur. Başlangıçta, mevsimsel üreyen memelilerde üreme sistemi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Ancak son 20 yılda, melatoninin diğer fizyolojik olaylardaki etkileri saptanmıştır.

Bu indolaminin, gece-gündüz döngüsü ile senkronize bir sirkadiyen paterne (gün içi ritme) sahiptir. Plazmada, gece 20.00-23.00 arası yükselen melatonin düzeyi 01.00-05.00 arası en üst seviyeye ulaşır ve gün doğumundan itibaren düşer. Sağlıklı kişilerde plazma melatonin düzeyi gündüz 0-20 pg/ml, gece 20-200 pg/ml (ortalama 60-70 pg/ml) dir. Melatoninin günlük yaklaşık üretim miktarı %80 i gece olmak üzere 30 mg'dır (Şener, 2010). Özellikle gece salgısı artan melatonin, kan-beyin bariyeri (Menendez-Pelaez ve diğerleri, 1993), plasenta (Okatani ve diğerleri, 1998) gibi tüm morfofizyolojik bariyerlerden kolaylıkla geçerek organizmadaki her hücreye girme yeteneğine sahiptir (Reiter ve diğerleri, 2000).

Yapılan araştırmalarda, Amerika'da yaklaşık 45 milyon kişi gece uykusuzluğu (insomnia) çekmektedir. Bu durum birçok hastalık nedeni olabilmektedir. Ayrıca yaşam kalitesinin düşmesi ile birlikte maddi ve manevi anlamda olumsuzluklara sebep olmaktadır. Yapılan bir çalışmada bu durumun en önemli nedenlerinden birinin de endojen melatonin sekresyonunun baskılanması olduğu belirtilmiştir (Ferguson, 2010).

Melatonin sentezi ile ilgili hemen hemen her şey memeli epifiz bezi incelenerek tespit edilmiştir (Reiter, 1991). Melatonin, amino asit triptofanın ürünüdür. Amino asit triptofan hücrelerin içine alınından sonra önce hidroksillenir sonra dekarboksillenerek 5-hidroksitriptamin (serotonin) oluşur. Serotonin, melatonin üreten organlarda (pineal bez, gastrointestinal sistem, deri, göz,... vb) asetillenir ve N-asetilserotonin oluşur. Melatonin oluşumundaki son enzim hidroksiindol-O-metiltransferaz (HIOMT), O-metilasyon ile N-asetilserotoninden N-asetil-5-metoksitriptamin (Melatonin)'i oluşturur (Şekil 2.8).



Şekil 2.8: Melatonin sentez basamakları (Reiter, 2000). Hidroksiindol-O-MetilTransferaz (HIOMT).

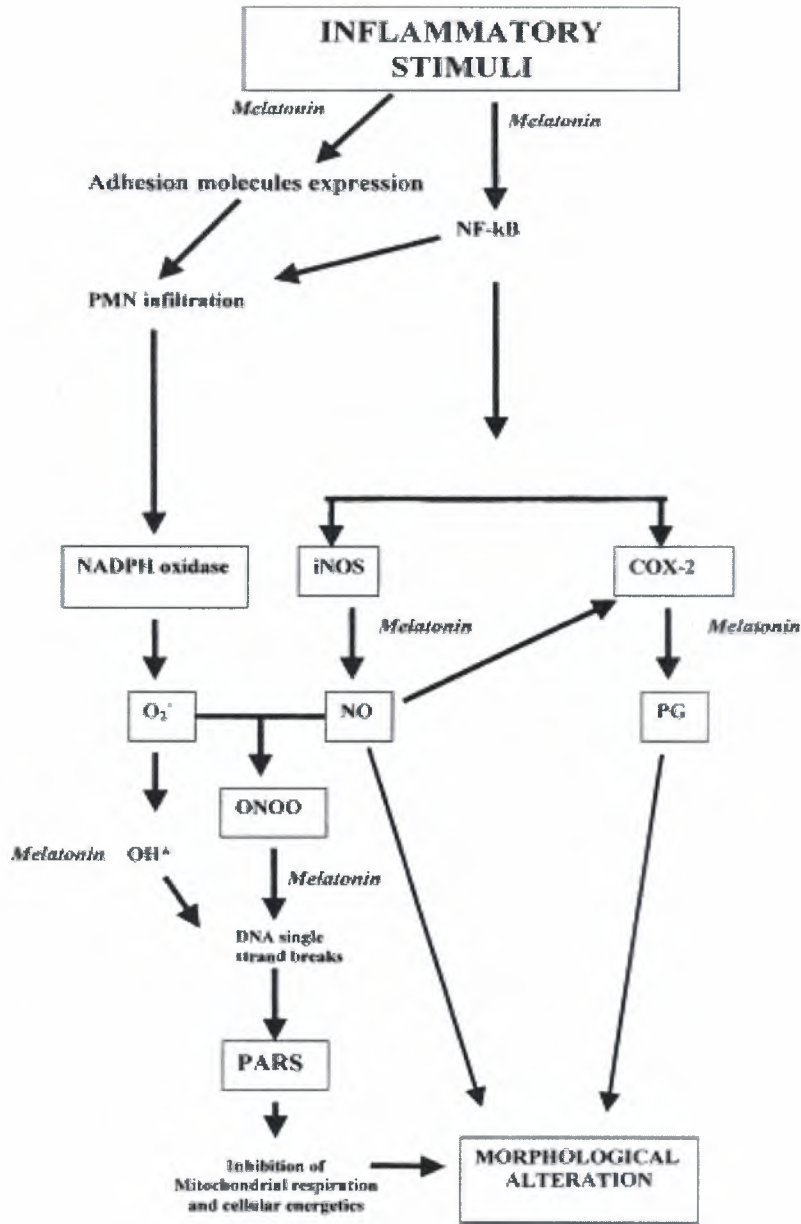
Bu ajanın, daha önce yapılan çalışmalarda antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri gösterilmiştir (Şehirli ve diğerleri, 2013; Borges Lda ve diğerleri, 2015). Antiinflamatuvar etkisini Nükleer Faktör-Kappa B (NF-κB) ile stimüle edilen adezyon moleküllerinin oluşumunu inhibe ederek, lökosit endotel adezyonunu ve lökositlerin endotel hücrelerinden migrasyonunu azaltarak ve böylece polimorfonükleer lökositlerin (PMN) inflamatuvar alanda toplanmasını önleyerek gerçekleştirdiği gösterilmiştir. Melatoninin inflamatuvar olaylar sırasında gerek direkt gerekse indirekt olarak serbest radikallerin neden olduğu sitokin ve proteolitik enzimlerin oluşumunu önleyerek doku hasarını engellediği belirtilmiştir (Cuzzocrea ve Reiter, 2002).

Pro-inflamatuvar faktörlerin (IL-1β, TNF-α,...), inflamatuvar yanıtta çeşitli hücrelerin (örneğin; kondrositler, osteositler,...) yaşlanmasını ve apoptozisini indüklediği bilinmektedir. Bu faktörler nedeniyle oluşan eklem dejeneratif

hastalıklarında, IL-1 β 'nın anabolik etkisi ile uyarılan hücre ölümünün üstesinden gelebilmek için birçok antioksidan molekül geliştirilmiştir. Bu moleküller arasında melatonin, antioksidan ve anti-inflamatuar etki gösterdiği kanıtlanmıştır (Liu ve diğerleri, 2013).

Melatoninin serbest radikal oluşumunu önleyici etkisi nöral ve kardiyovasküler fonksiyonların fizyolojik düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Melatoninin serbest radikaller üzerindeki süpürücü etkisi onun aynı zamanda güçlü bir antiinflamatuvar ajan olduğunu da açıklamaktadır. İnflamasyonun uyarılmasıyla doku hasarına giden yolak üzerinde çeşitli kademelerde melatonin ile blokaj bu ajana antiinflamatuvar ve doku koruyucu etki sağlamaktadır (Sehirli ve diğerleri, 2013)

Şekil 2.9 da inflamasyonun indüklediği adhezyon molekül ekspresyonu, NF- κ B, iNOS, PG, süperoksid ve peroksi nitrit radikallerinin doku hasarındaki rolü ve melatoninin bu etkenlerin oluşumlarının baskılanması ile antiinflamatuvar etkisi özetlenmiştir (Cuzzocrea ve Reiter, 2001). Çeşitli inflamasyon modellerinde (yanık hasarı, sepsis, iskemi/reperfüzyon gibi) nötrofil aktivasyonunun dokularda neden olduğu oksidan hasarları melatonin anlamlı olarak geri çevirmiştir (Şener ve diğerleri, 2002a; Şener ve diğerleri, 2002b; Şener ve diğerleri, 2003).



Şekil 2.9: Melatonin antiinflamatuvar mekanizması (Cuzzocrea ve Reiter, 2002). Nitrik Oksit (NO), hidroksil radikal ($\cdot\text{OH}$), peroksinitrit ($\text{ONOO}\cdot$) indüklenen NO sentaz (iNOS), nükleer faktör kB (NF-kB). superoksit anyon ($\text{O}_2^{\cdot-}$) peroksinitröz asit (ONOOH) poli (ADP-riboz) sentaz (PARS), siklooksijenaz (COX-2), prostaglandin (PG).

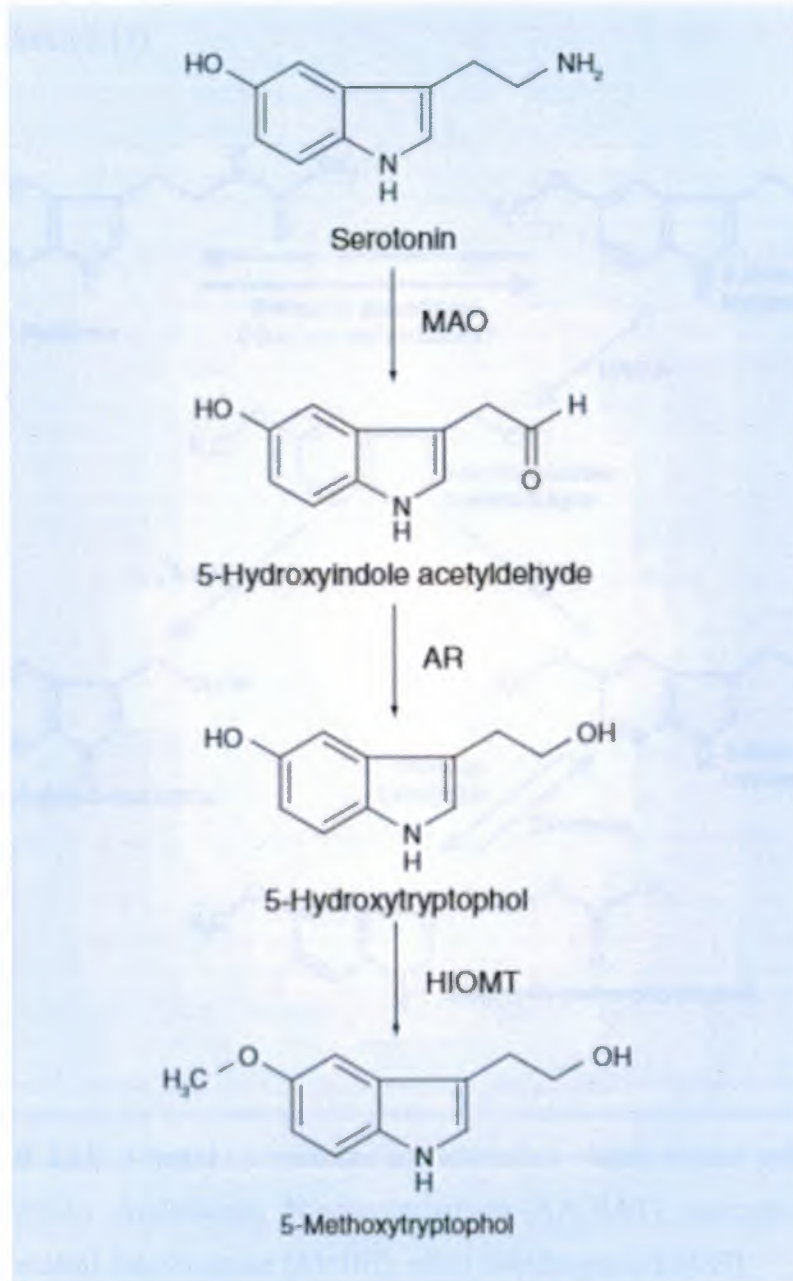
2.4 5-Metoksitriptofol (5-MTX)

5-metoksitriptofol (5-MTX), pineal bezden sentezlenen bir hormondur. Seratoninden sentezlenen bu indolaminin amfibiler, sürüngenler, balıklar, kuşlar ve memelilerde biyolojik olarak aktif olduğu gösterilmiş olup fizyolojik olarak güneş gibi ışınsal uyarıcılarla düzenlenmektedir. Bazı araştırmacılar 5-metoksitriptofol'un, melatonin ile benzer endokrin etkileri olduğunu ve kan içinde 24 saatlik sirkadiyen paterni olduğunu bildirmektedirler. Bu indolamin, melatoninin aksine fotoperiyota bağımlı olarak gündüz salınım göstermekte olup kandaki seviyeleri melatonin düzeyi ile ters orantılıdır (Ouzir ve diğerleri, 2013).

Çeşitli omurgalı türünde ve gastropodlarda yapılan çalışmalarda 5-MTX'in sirkadiyen ve "mevsimsel" ritimleri saptanmıştır. Örneğin; insanlarda yapılan bir çalışmada, 5-MTX'in seviyesi kısa fotoperiyot olan Ocak ile Mart ayları arasında araştırılmış, gün süresince yüksek konsantrasyonlarda gece süresince düşük konsantrasyonlarda olduğu saptanmıştır. Nitekim 5-MTX'in, yaz aylarında fotoperiyota bağlı olarak üretiminin fazla olmasından ötürü kış aylarına göre geceleyin plazmada daha yüksek konsantrasyonlarda olduğu bulunmuştur. Bu veriler sonucunda, pineal bezin 5-MTX sentezinde fotoperiyottan etkilendiği saptanmıştır (Hofman ve diğerleri, 1995).

5-MTX sentezinin 2 yolu vardır.

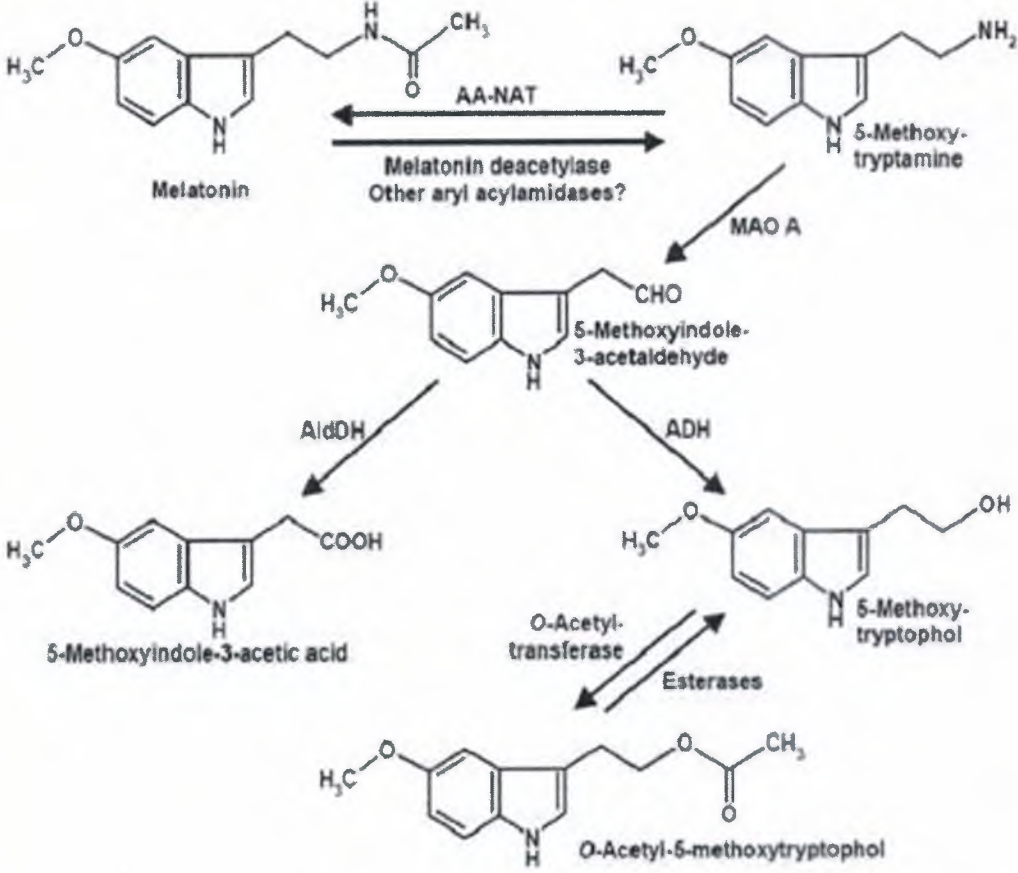
1.si serotoninin oksidatif monoamin oksidaz (MAO) tarafından deaminasyonu ile başlar. Serotonin, MAO tarafından oksidasyon mekanizmasıyla 5-hidroksiindol asetaldehite deamine edilir. Ardından aldehit redüktaz (AR) enziminin katalitik aktivasyonu ile 5-hidroksiindol asetaldehit 5-hidroksitriptophol'a indirgenir. 5-hidroksitriptophol'un 5-hidroksiindol-O-metiltransferaz (HIOMT) enzimi tarafından metilasyonu gerçekleştirilerek 5-MTX oluşur (Balemans ve diğerleri, 1980) (Şekil 2.10)



Şekil 2.10: (Ouzir ve diğerleri, 2013). Monoamin Oksidaz (MAO), Aldehit Redüktaz (AR), 5-Hidroksiindol-O-Metiltransferaz (HIOMT).

Bununla birlikte 2.ci olarak, retina (Grace ve diğerleri, 1991), böbrek ve karaciğerde (Rogawski ve diğerleri, 1979) diğer bir metabolik mekanizma ile 5-MTX, MEL'den oluşmaktadır. Melatonin deasetilasyon ile 5-metoksitriptamine döner.

Ardından 5-metoksitriptamin, deaminasyon ile 5-metoksiindolasetik asidi ve 5-MTX'i oluşturur. (Şekil 2.11)



Şekil 2.11: 5-metoksitriptofolun melatoninden oluşan sentez yolağı (Wu ve diğerleri, 2014). Aralkilamin N-acetyltransferaz (AA-NAT), monoamin oksidaz (MAO A), aldehyt dehidrogenaz (AldDH), alkol dehidrogenaz (ADH).

Melatonin gibi 5-MTX'in de yapılan çalışmalarda, birçok organ hücresine girebilme yeteneğine sahip olduğu saptanmıştır. Özellikle kan-beyin bariyerinde bulunan reseptörlerle beyine geçebilmektedir (Alebouyeh ve diğerleri, 2003). Bununla birlikte, tiroid, adrenal bezler, yumurtalıklar ve rahim hücrelerinde yüksek konsantrasyonlarda bulunabilmektedir ve idrarda metabolize olabilmektedir (Ouzir ve diğerleri, 2013).

Lissoni ve diğerkleri 1996'da yaptıkları bir çalışmada, 5-MTX'in serumdaki immün sistemi stimüle edici sitokin olan IL-6 seviyelerini azalttığını ve immünsüpresif olan IL-2'nin melatonin sentezine kadar artış gösterdiğini saptamışlardır. 5-MTX'in melatonine göre zıt sirkadiyen ritmi saptandığına göre; Lissoni ve arkadaşları, günün farklı saatlerinde etki gösteren bu iki indolaminin immünostimulan etkilerinden yararlanmak için birlikte kullanılmalarını önermektedirler (Lissoni ve diğerkleri, 1996).

5-metoksitriptofol, fizyolojik ve nöroendokrin fonksiyonlarda yer almaktadır. Ancak salınımindaki hücrel ve moleküler mekanizmalar hala daha bilinmemektedir. Bununla birlikte serbest radikallerin uzaklaştırılması ve antioksidan etkinliği nedeniyle melatonine benzerlik göstermektedir. Ayrıca yapılan çalışmalarda, 5-MTX'in nikotinik ve muskarinik reseptörlerde güçlü ve rekabetçi olmayan inhibitör olarak görev yaptığı saptanmıştır (Fernando ve diğerkleri, 1983). Melatoninin eklem artritü üzerindeki anti-inflamatuar ve antioksidan etkinliği daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Jimenez-Caliani ve diğerkleri, 2005). Ancak yeni yapılan in vitro çalışmada, 5-MTX'in kemik hücreleri üzerinde osteoklastik aktiviteyi inhibe ettiğı ve osteoblastik aktiviteyi arttırdığı saptanmıştır. Bu çalışmaya göre, 5-MTX'in osteoblast diferansiasyonunu MEL'e göre daha fazla stimüle ettiğı saptanmış olup, osteokalsin sekresyonunu arttırdığı net bir şekilde görülmüştür (Satué ve diğerkleri, 2015). Ancak 5-MTX'in artrit üzerine etkisi araştırılmamış olup bizim çalışmamızla bu bir ilk olmuştur.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

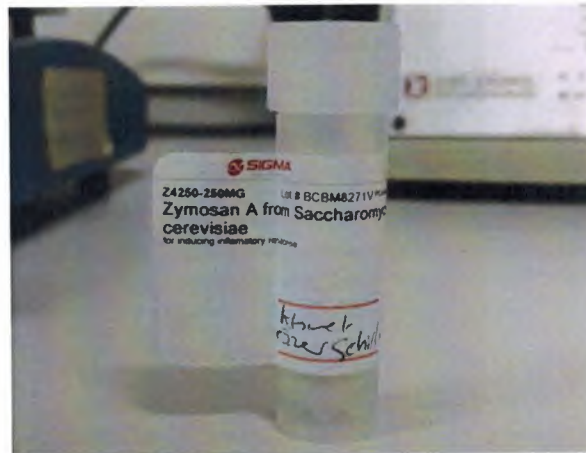
Bu çalışma Medipol Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu'nun onayı (Karar No: 38328770-46) alınarak yapılmıştır. Çalışmamızda 200-250 gr. ağırlığında her iki cinsten Wistar albino sıçanlar kullanıldı. Hayvanlar, deney öncesi iki haftalık sürede laboratuvar koşullarına ($20^{\circ}\text{C} \pm 2$, 12 saat aydınlık/12 saat karanlık) alıştırdı.

3.1. Gruplar ve Deney Protokolü

Çalışmamızda her biri 8 sıçandan oluşan 5 grup oluşturuldu.

1. **KONTROL GRUBU:** Bu gruptaki sıçanlara ketamin (100 mg/kg) anestezisi altında 40 μl serum fizyolojik temporomandibular ekleme intraartiküler olarak uygulandı.

2. **TEMPORAMANDİBULAR EKLEM ARTRİT (TMEA) GRUBU:**
2 mg Zymosan (Şekil 3.1) 40 μl serum fizyolojik içinde çözülüp Temporomandibular ekleme 30 gauge 1 ml insülin enjektörü ile intraartiküler (i.a.) (Şekil 3.2) olarak uygulandı (Chaves ve diğerleri, 2011). (i.a. enjeksiyon: Sıçanların TME üzerindeki derisi tıraşlandı. Zigomatik arkın posteroinferior hattı palpe edilerek enjeksiyon noktası belirlendi. Enjektör kondile temas edene kadar medial ve anterior yönde ilerletildi. Mandibula hareket ettirilerek kapsül içine girildi ve enjeksiyon gerçekleştirildi). Yapılan bu işleminden 15 dakika önce sıçanlara i.p. olarak 0.1 ml/100gr SF uygulaması yapıldı.



Şekil 3.1: Zymosan (Z4250 Zymosan Sigma-Aldrich)



Şekil 3.2: Sıçana intraartiküler zymosan uygulaması.

3. **TMEA - 5-METOKSİTRİPTOFOL (5-MTX) GRUBU:** Zymosan (i.a.) enjekte edilmeden 30 dakika önce 5 mg/kg 5-MTX (Şekil 3.3) intraperitoneal (i.p.) (Şekil 3.4) olarak uygulandı. (i.p. enjeksiyon: Sıçanların abdominal bölgesine insülin enjektörüyle 45 derece girilir, negatif aspirasyon mevcut ise enjeksiyon yapılır.)



Şekil 3.3: 5-Methoxytryptophol (Syninnova).



Şekil 3.4: 5-Metoksitriptofol'un intraperitoneal uygulaması

4. **TMEA - MELATONİN (MEL) GRUBU** Zymosan uygulanmasından 15 dakika önce 10 mg/kg MEL (Şekil 3.5) intraperitoneal (i.p.) (Şekil 3.6) olarak uygulandı.



Şekil 3.5: Melatonin (Sigma-Aldrich)



Şekil 3.6: Melatonin intraperitoneal uygulaması

5. TMEA – MEL + 5-MTX GRUBU: Zymosan uygulanmasından 30 dakika önce, 5 mg/kg 5-metoksitriptofol intraperitoneal (i.p.) ve 15 dakika önce 10 mg/kg MEL intraperitoneal (i.p.) olarak uygulandı.

Zymosan uygulamasından 6 saat sonra ketamin anestezisi altında (100mg/kg) sıçanların superfisiyal dokuları diseke edildi ve TME kavitesi pompalama ve aspirasyon tekniğiyle 0.05 ml etilen diamin tetra asetikasit (EDTA) çözeltisi ile iki kez yıkanarak sinoviyal sıvı toplandı ve sıçanlar dekapite edildi. Sinoviyal sıvıda Tümör Nekrozis Faktör-alfa (TNF- α) , İnterlökin 1-beta (IL-1 β) düzeyleri ile matriks metalloproteinaz (MMP-2 ve MMP-9) aktiviteleri ölçüldü.

Artiküler dokuda ise inflamatuvar yolakları değerlendirmek için COX-1, COX-2 enzim aktiviteleriyle, Raf-1 ve STAT3 düzeyleri ise Real Time-Polimerase Chain Reaction (RT-PCR) tekniğiyle ile incelendi. Sinoviyal ve artiküler dokulardaki yapısal hasar histolojik olarak değerlendirildi (Holwegner ve diğerleri, 2015) (Şekil 3.7).



Şekil 3.7: Sinoviyal sıvı toplanması ve rezeke edilen sıçan mandibulası

3.2. Sinoviyal Sıvıda Tümör Nekrozis Faktör- α (TNF- α) tayini

Sinoviyal sıvıda TNF- α tayini ELISA yöntemi ile (*BioSource Europe S.A. Catalog No.KRC 3014, Nivelles, Belgium*) rat kiti kullanılarak ölçüldü.

Deneyin Yapılışı

1. Boş ELISA kuyularına 50 μ l inkubasyon buffer kondu.
2. Standart ve kontrollerin hepsi sulandırıldı.
3. 6 tane tüpe ya da ependorfa standart hazırlayarak değişik konsantrasyonlarda dilüe edildi.

Standartı dilüe etmek için;

1. tüpe 400 μ l standart diluent buffer + 100 μ l hazırlanan standarttan kondu.
- 2.tüpe: 1. tüpten 250 μ l + 250 μ l standart diluent buffer
3. tüpe: 2. tüpten 250 μ l + 250 μ l standart diluent buffer
4. tüpe: 3. tüpten 250 μ l + 250 μ l standart diluent buffer
5. tüpe: 4. tüpten 250 μ l + 250 μ l standart diluent buffer
6. tüpe: 5. tüpten 250 μ l + 250 μ l standart diluent buffer

7. tüp: Sadece 250 µl standart diluent buffer

8. tüp: 100 µl high control

9. tüp: 100 µl low control

10. tüpten itibaren örnekler hazırlandı. Bunun için 100 µl sinoviyal sıvı +100 µl standart diluent buffer kondu.

4. ELISA kuyularındaki 50 µl'lik inkubasyon buffer'ın üzerine yukarıdaki gibi hazırlanan tüplerden 100'er µl ilave edildi. Toplam ELISA kuyularındaki çözelti miktarı 150 µl oldu.

5. Üzerine 50 µl *Biotin conjugate* eklendi.

6. 1.5 saat oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi.

7. Yıkama solüsyonu (300 µl) ile 4 kez yıkama yapılır ve döküldü. (Yıkama solüsyonu 25X'tir. Yani 4 ml *wash buffer*'dan alınır 100 ml'ye distile su ile tamamlandı.)

8. Üzerine 100 µl Streptavidin HRP solüsyonu eklendi. (Streptavidin HRP solüsyonu, 100X her 8'lik strip için 10 µl streptavidin HRP'den alınıp üzerine 1 ml streptavidin HRP diluent eklendi)

9. 45 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi.

10. Yıkama solüsyonu ile 4 kez yıkama yapıldı ve döküldü.

11. 100 µl *stabilised chromogen* eklendi.

12. 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

13. 100 µl *stop solutionu* eklendi.

14. 450 nm'de ELISA'da okundu.

3.3. Sinoviyal Sıvıda İnterlökin- 1 β (IL-1 β) tayini

Sinoviyal sıvıda IL-1 β (ELISA, BioSource Catalog No.KRC0011, Nivelles, Belgium) tayini için uygun kitler kullanılarak talimatlara uygun olarak ölçümler yapıldı.

Deneyin Yapılışı

1. Standart ve kontrollerin hepsi sulandırıldı.
2. 6 tane tüpe ya da ependorfa standart hazırlayarak değişik konsantrasyonlarda dilüe edildi.

Standartı dilüe etmek için; 1. tüpe 480 μ l standart diluent buffer + 120 μ l hazırlanan standarttan kondu.

- 2.tüpe: 1. tüpten 300 μ l + 300 μ l standart diluent buffer
3. tüpe: 2. tüpten 300 μ l + 300 μ l standart diluent buffer
4. tüpe: 3. tüpten 300 μ l + 300 μ l standart diluent buffer
5. tüpe: 4. tüpten 300 μ l + 300 μ l standart diluent buffer
6. tüpe: 5. tüpten 300 μ l + 300 μ l standart diluent buffer
7. tüp: Sadece 300 μ l standart diluent buffer
8. tüp: 100 μ l high control
9. tüp: 100 μ l low control

10. tüpten itibaren örnekler hazırlanır. Bunun için 100 μ l sinoviyal sıvı +100 μ l standart diluent buffer kondu.

3. ELISA kuyularına yukarıdaki gibi hazırlanan tüplerden 100'er μ l ilave edildi. Toplam ELISA kuyularındaki çözelti miktarı 100 μ l oldu.

4. 3 saat oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi.

5. Yıkama solüsyonu (300 µl) ile 4 kez yıkama yapıldı ve döküldü. (Yıkama solusyonu 25X'tir. Yani 4 ml *wash buffer*'dan alınır 100 ml'ye distile su ile tamamlandı.)

6. Üzerine 100 µl *Biotin conjugate* eklendi.

7. 1.saat oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi.

8. Yıkama solüsyonu (300 µl) ile 4 kez yıkama yapıldı ve döküldü. (Yıkama solusyonu 25x'tir. Yani 4 ml *wash buffer*'dan alınır 100 ml'ye distile su ile tamamlandı.)

9. Üzerine 100 µl Streptavidin HRP solusyonu eklendi. (Streptavidin HRP solusyonu, 100X her 8'lik strip için 10 µl streptavidin HRP'den alınıp üzerine 1 ml streptavidin HRP diluent eklendi)

10. 30 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi.

11. Yıkama solusyonu ile 4 kez yıkama yapıldı ve döküldü.

12. 100 µl *stabilised chromogen* eklendi.

13. 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

14. 100 µl *stop solutionu* eklendi.

15. 450 nm'de ELİSA'da okundu.

3.4. Sinoviyal Sıvıda Matriks Metalloproteinaz-2 (MMP-2) Tayini

Sinoviyal sıvıda MMP-2 tayini için uygun kitler (*ELISA, Abnova Catalog No. KAO393, Taoyuan, Taiwan*) kullanılarak talimatlara uygun olarak ölçümler yapıldı.

Deneyin Yapılışı

1. Rat MMP-2, *High control*, *low control* ve standartların hepsi sulandırıldı.

2. 6 tane tüpe ya da ependorfa standart hazırlayarak değişik konsantrasyonlarda dilüe edildi.

Standartı dilüe etmek için; 1. tüpe 1000 µl standart diluent buffer + 1000 µl hazırlanan standarttan kondu.

2. tüpe: 1. tüpten 300 μ l + 300 μ l standart diluent buffer
3. tüpe: 2. tüpten 300 μ l + 300 μ l standart diluent buffer
4. tüpe: 3. tüpten 300 μ l + 300 μ l standart diluent buffer
5. tüpe: 4. tüpten 300 μ l + 300 μ l standart diluent buffer
6. tüpe: 5. tüpten 300 μ l + 300 μ l standart diluent buffer
7. tüp: Sadece 300 μ l standart diluent buffer
8. tüp: 100 μ l high control
9. tüp: 100 μ l low control
10. tüpten itibaren örnekler hazırlandı. Bunun için 100 μ l sinoviyal sıvı +100 μ l standart diluent buffer kondu.
3. Elisa kuyularına yukarıdaki gibi hazırlanan tüplerden 100'er μ l ilave edildi. Toplam elisa kuyularındaki çözelti miktarı 100 μ l oldu.
4. 37 °C'de karanlıkta 90 dakika inkübe edildi.
5. 100 μ l *biotinylated anti-rat MMP-2 antibody* çalışma solusyonu ilave edildi. 37 °C'de karanlıkta 60 dakika inkübe edildi.
6. Yıkama solusyonu (300 μ l) ile 3 kez her tüpte 1 dakika kalacak şekilde yıkama yapıldı ve döküldü. (Yıkama solusyonu 0.1 M *Tris Buffers* (TBS) ile 0.1 M fosfat buffer solusyonu (PBS.)
7. Üzerine 100 μ l *Avitin-Biotin Peroxidase Complex* (ABC) çalışma solusyonu eklendi ve 37 °C'de karanlıkta 30 dakika inkübe edildi.
8. Yıkama solusyonu (300 μ l) ile 5 kez her tüpte 1 dakika kalacak şekilde yıkama yapıldı ve döküldü.
9. Üzerine 90 μ l 3,3',5,5'-*Tetramethylbenzidine* (TMB) renk solusyonu eklendi.
10. 37 °C'de karanlıkta 25-30 dakika inkübe edildi.
11. Üzerine 100 μ l TMB stop solusyonu eklendi ve renk sarıya döndü.

12. 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

13. 450 nm'de ELİSA'da okundu.

3.5. Sinoviyal Sıvıda Matrix Metalloproteinaz-9 (MMP-9) Tayinleri

Sinoviyal sıvıda MMP-9 (*ELISA, Abnova Catalog No. KAO398, Taoyuan, Taiwan*) tayinleri için uygun kitler kullanılarak talimatlara uygun olarak ölçümler yapıldı.

1. Rat MMP-9, *High control, low control* ve standartların hepsi sulandırıldı.

2. 6 tane tüpe ya da ependorfa standart hazırlayarak değişik konsantrasyonlarda dilüe edildi.

Standartı dilüe etmek için; 1. tüpe 1000 µl standart diluent buffer + 1000 µl hazırlanan standarttan kondu.

2.tüpe: 1. tüpten 300 µl + 300 µl standart diluent buffer

3. tüpe: 2. tüpten 300 µl + 300 µl standart diluent buffer

4. tüpe: 3. tüpten 300 µl + 300 µl standart diluent buffer

5. tüpe: 4. tüpten 300 µl + 300 µl standart diluent buffer

6. tüpe: 5. tüpten 300 µl + 300 µl standart diluent buffer

7. tüp: Sadece 300 µl standart diluent buffer

8. tüp: 100 µl high control

9. tüp: 100 µl low control

10. tüpten itibaren örnekler hazırlandı. Bunun için 100 µl serum +100 µl standart diluent buffer kondu.

3. ELISA kuyularına yukarıdaki gibi hazırlanan tüplerden 100'er µl ilave edildi. Toplam ELISA kuyularındaki çözelti miktarı 100 µl oldu.

4. 37 °C'de karanlıkta 90 dakika inkübe edildi.

5. 100 µl *biotinylated anti-rat MMP-9 antibody* çalışma solusyonu ilave edildi. 37 °C’de karanlıkta 60 dakika inkübe edildi.

6. Yıkama solusyonu (300 µl) ile 3 kez her tüpte 1 dakika kalacak şekilde yıkama yapıldı ve döküldü. (Yıkama solusyonu 0.1 M *Tris Buffers* (TBS) ile 0.1 M fosfat buffer solusyonu (PBS).)

7. Üzerine 100 µl *Avitin-Biotin Peroxidase Complex* (ABC) çalışma solusyonu eklenir 37 °C’de karanlıkta 30 dakika inkübe edildi.

8. Yıkama solusyonu (300 µl) ile 5 kez her tüpte 1 dakika kalacak şekilde yıkama yapıldı ve döküldü.

9. Üzerine 90 µl *3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine* (TMB) renk solusyonu eklendi.

10. 37 °C’de karanlıkta 25-30 dakika inkübe edildi.

11. Üzerine 100 µl TMB *stop solusyonu* eklendi ve renk sarıya döndü.

12. 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

13. 450 nm’de ELİSA’da okundu.

3.6. Siklooksijenaz 1 ve 2 (COX-1, COX-2), *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma-1* (Raf-1) ve *Signal Transducer and Activator of Transcription 3* (STAT3)

Mandibular eklem ve periaurikuler dokular çözülme solüsyonu içinde homojenize edildi. Homojenizasyondan sonra hemen homojenatlar kullanıldı.

3.6.1. Ribo Nükleik asit (RNA) İzolasyonu ve complementary-Deoksiriboz Nükleik Asit (cDNA) Preperasyonu

Total RNA, *Roche High Pure RNA Tissue Kit* kullanılarak üreticinin talimatları doğrultusunda izole edildi. cDNA, *Roche Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit* ile talimatlar doğrultusunda transkript edildi. izole edilen 10 µl’lik RNA 2 µl

primer hexamerin içine eklendi. Toplam 12 µl, 65°C'de 10 dakika boyunca inkube edildi. 4 µl *Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase Reaction* Koruyucu, 0.5 µl *Protector RNase Inhibitorü*, 2 µl *Deoxynucleotide Karışımı*, 1 µl DTT, 1.1 µl *Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase* eklendi, iyice karıştırıldı ve 10 dakika 29°C, 60 dakika 48°C ve 5 dakika 85°C'de karanlıkta inkube edildi. Sonra buz içine yerleştirildi. Bu aşamadan sonra elde edilen cDNA örnekleri 80 °C'de saklandı.

3.6.2. Real Time-Polimerase Chain Reaction (RT-PCR) Reaksiyonları

Real Time-PCR, ayarları *QIAGEN QuantiTect SYBR Green PCR Kit* ile önceden geliştirilmiş ve doğrulanmış olup talimatlara göre kullanıldı. COX-1, COX-2, Raf-1 ve STAT3 genleri *QIAGEN QuantiTect Primer Tahlili* ile analiz edildi. Her bir gen için primer prob karışımı *QIAGEN* firmasından satın alınmış olup üreticinin talimatları ile *QuantiTect Probe RT-PCR Kit* ile işlendi. cDNA (4 µl) 16 µl'lik reaksiyon hacmi içinde kullanılmıştır. 10 µl probe master, 2 µl primer prob ve 4 µl SdH₂O her bir kaba konuldu. *Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase* (HPRT) homekeeper geni olarak kullanılmıştır ve pozitif kontroller, her gen için problara eklendi. RT-PCR reaksiyonları şu şekilde belirtildi: 95 °C'de 15 dakika ilk denaturasyon yapıldıktan sonra 94°C 15 saniye, 55°C 30 saniye ve 72°C 30 saniye sırasıyla santrifüj edildi.

Analiz ve kantifikasyon *LightCycler 480* yazılımı kullanılarak yapıldı.

3.7. Histolojik İncelemeler

Işık mikroskobu: Dokular % 10'luk formol solusyonuna alındıktan sonra en az 3 saat veya 1 gece kaldıktan sonra çeşme suyunda yıkandı ve artan alkol konsantrasyonları ile dehidratasyon (% 70'lik alkol ile 15 dakika, % 90'lık alkol ile 15 dakika, % 96'lık alkol ile 30 dakika, %100'lük alkol ile iki kere 30 dakika, % 100'lük toluen ile 2 kere 30 dakika) yapıldı, ardından 1 gece parafinde 60 °C'de bekletildi, ertesi gün doku parafin bloklara gömüldü.

Bloklama işleminden sonra dokulardan 5-6 mm kalınlığında kesitler alınarak lama yerleştirildi ve parafinden kurtarma işlemi için 2 saat toluende bırakıldı, ardından alkolün azalan konsantrasyonları ile suya indirgenme (% 100'lük alkol ile 2 dakika, % 90'luk alkol ile 2 dakika, % 70'lik alkol ile 2 dakika muamele edildi.) yapıldı ve distile suya bırakıldı, 15 dakika hematoksilen ile muamele edildikten sonra çeşme suyunda 10 dakika hematoksilen işlemi için bırakıldı. Eosin ile 5 dakika ilave olarak distile su uygulandıktan sonra tekrar alkolün artan konsantrasyonları ile dehidratasyon (% 70'lik alkol ile 2 dakika, %90'luk alkol ile 2 dakika, % 96'lık alkol ile 2 dakika, % 100'lük alkol ile 10 dakika) yapıldı ardından toluen ile 2 kere yıkandı (1. Banyo 5 dakika, 2. Banyo 10 dakika) ve entellan ile dokunun üzeri kapatıldı, doku ışık mikroskobu düzeyinde incelendi.

3.8. İstatistik Yöntemi

Çalışmamızda sinoviyal sıvıda, TNF- α , IL-1 β , MMP-2 ve MMP-9 düzeyleri ve temporomandibular eklem dokusunda ölçülen COX-1, COX-2, Raf-1 ve STAT3 proteinlerinin düzeylerinin gruplar arası karşılaştırılması tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile incelenmiş olup ikili karşılaştırmalar da ileri analiz olarak Tukey's testi kullanılmıştır.

P değerinin 0.05'ten küçük olduğu durumlar anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmamızda sinoviyal sıvıda, TNF- α , IL-1 β , MMP-2 ve MMP-9 düzeyleri ile temporomandibular eklem dokusunda ölçülen COX-1, COX-2, Raf-1 ve STAT3 proteinlerinin düzeylerinin gruplar arası karşılaştırılması tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile incelenmiş ve ikili karşılaştırmalarda Tukey's testi kullanılmıştır.

P değerinin 0.05'ten küçük olduğu durumlar anlamlı olarak kabul edildi.

4.1. Sinoviyal Sıvıya Ait Bulgular:

Temporomandibular eklem artrit (TMEA) yapılan grupta sinoviyal sıvıya ait TNF- α , IL-1 β (Tablo 4.1, Şekil 4.1), MMP-2 ve MMP-9 (Tablo 4.2, Şekil 4.2) düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Buna karşılık MEL, 5-MTX ile MEL+5-MTX uygulanan grupta ise TMEA grubundaki artış anlamlı olarak düşmüştür. Sadece MEL ve sadece 5-MTX uygulanan grupta MMP-2 ve MMP-9 düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek kalmış TNF- α , IL-1 β düzeylerinde ise kontrol değerlerine yaklaşmıştır. Kombine uygulama ile tek başına yapılan uygulamalar arasında ise MMP-2 düzeylerinde sadece MEL uygulanan gruba göre anlamlı olarak azalma görülmüş diğer parametrelerde ise farklılık bulunmamıştır.

4.2. Dokuya Ait Bulgular:

4.2.1. Siklooksijenaz-1 ve Siklooksijenaz-2 (COX-1 ve COX-2) Bulguları

Temporomandibular eklem artrit (TMEA) yapılan grupta eklem ait COX-2 düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Buna karşılık MEL, 5-MTX ile MEL+5-MTX uygulanan grupta ise TMEA grubundaki artış anlamlı olarak düşmüş kontrol grubu değerlerine yaklaşmıştır. COX-1 düzeyleri incelendiğinde ise gruplar arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir (Tablo 4.3, Şekil 4.3).

4.2.2. *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma-1 (Raf-1) ve Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) Bulguları*

Temporomandibular eklem artrit (TMEA) yapılan grupta ekleme ait Raf-1 ve STAT-3 düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Buna karşılık MEL, 5-MTX ile MEL+5-MTX uygulanan grupta ise TMEA grubundaki artış anlamlı olarak düşmüştür. Sadece MEL ve sadece 5-MTX uygulanan grupta Raf-1 ve STAT-3 düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek kalmıştır. Kombine uygulama ile tek başına yapılan uygulamalar arasında ise Raf-1 düzeylerinde sadece MEL uygulanan gruba göre anlamlı olarak azalma görülmüş diğer parametrede ise farklılık bulunmamıştır (Tablo 4.4, Şekil 4.4).

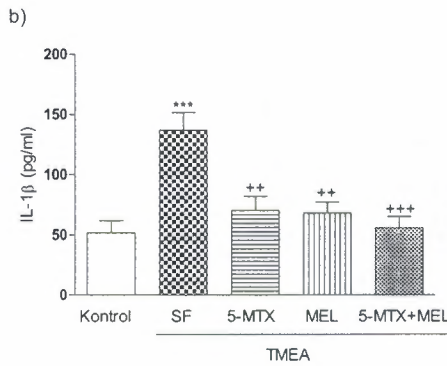
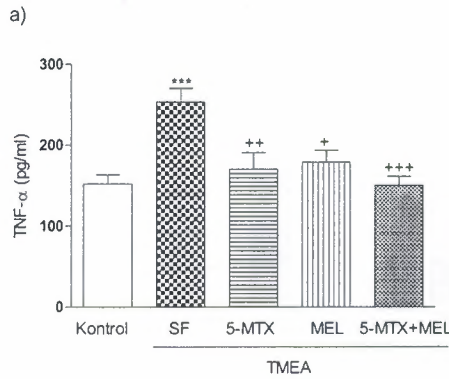
4.3. Histolojik Bulgular

Kontrol grubu, sinovial doku sinoviyositler ile düzgün bir görünüm sergilerken (Şekil 4.5a) TMEA grubu sinoviosit yoğunluğunda artış ve kapiler konjesyon ile belirgin hasar göstermiştir (Şekil 4.5b). TMEA ve 5-MTX grubunda konjesyon gerilemekle birlikte hücre yoğunluğu azalarak devamlılık göstermiştir (Şekil 4.5c). TMEA ve MEL grubunda konjesyonun gerilediği ve hücre yoğunluğunda da belirgin azalma izlendi (Şekil 4.5d). TMEA-MEL + MTX grubunda sinoviosit yoğunluğunda bariz azalma gözlemlendi (Şekil 4.5e).

Kontrol grubu, mandibular kondilde düzgün morfoloji gözlenirken (Şekil 4.6a) TMEA grubunda artiküler dejenerasyon ve diskte konjesyon saptanmıştır (Şekil 4.6b). TMEA ve 5-MTX grubunda artiküler dejenerasyonda azalma tespit edilmiştir (Şekil 4.6c). TMEA ve MEL grubunda ise 5-MTX uygulaması gibi dejenerasyonda azalma tespit edilmiştir (Şekil 4.6d). TMEA-MEL + 5-MTX grubunda ise bariz şekilde dejenerasyonun azaldığı görülmüştür (Şekil 4.6e).

Tablo 4.1: Sıçanlarda yapılan temporomandibular eklem artrit (TMEA) modelinde tüm grupların sinoviyal sıvıya ait Tümör Nekrozis Faktör- α (TNF- α), Interlökin-1 β (IL-1 β) değerleri. MEL: Melatonin, 5-MTX: 5-Metoksitriptofol.

	Kontrol	TMEA	TMEA-5-MTX	TMEA-MEL	TMEA-MEL+5-MTX
TNF- α (pg/ml)	152 $\pm$ 11	254 $\pm$ 17 ***	171 $\pm$ 11 ++	179 $\pm$ 15 +	150 $\pm$ 11 ++
IL-1 β (pg/ml)	51.8 $\pm$ 9.9	136.8 $\pm$ 14.8***	70.3 $\pm$ 11.5 ++	68.2 $\pm$ 9.1 ++	55.6 $\pm$ 9.6 ***



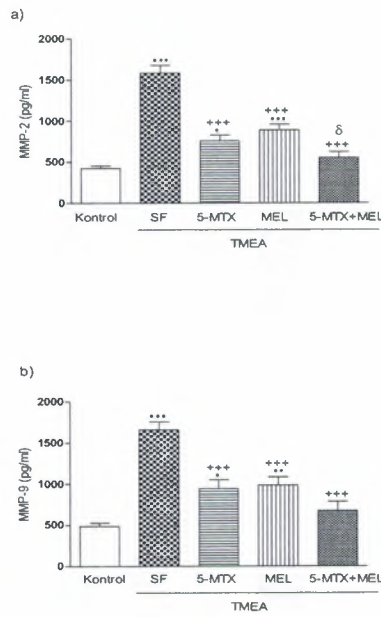
Şekil 4.1: Sıçanlarda yapılan temporomandibular eklem artrit (TMEA) modelinde tüm grupların sinoviyal sıvıya ait Tümör Nekrozis Faktör- α (TNF- α), Interlökin-1 β (IL-1 β) değerleri. MEL: Melatonin, 5-MTX: 5-metoksitriptofol.

*** $p < 0.001$ Kontrol grubuna göre karşılaştırmalar,

+ $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ TMEA grubuna göre karşılaştırmalar.

Tablo 4.2: Sıçanlarda yapılan temporomandibular eklem artrit (TMEA) modelinde tüm grupların sinoviyal sıvıya ait Matriks Metalloproteinaz-2 (MMP-2) ve MMP-9 değerleri. MEL: Melatonin, 5-MTX: 5-Metoksitriptofol.

	Kontrol	TMEA	TMEA-5-MTX	TMEA-MEL	TMEA-MEL+5-MTX
MMP-2 (pg/ml)	424 ± 32	1584 ± 92 ***	757 ± 70 *, +++	886 ± 70 ***, +++	549 ± 74 +++, ^δ
MMP-9 (pg/ml)	486 ± 39	1656 ± 99 ***	942 ± 107 *, +++	981 ± 100 **, +++	671 ± 113 +++)



Şekil 4.2: Sıçanlarda yapılan temporomandibular eklem artrit (TMEA) modelinde tüm grupların sinoviyal sıvıya ait Matriks Metalloproteinaz-2 (MMP-2) ve MMP-9 değerleri. MEL: Melatonin, 5-MTX: 5-Metoksitriptofol.

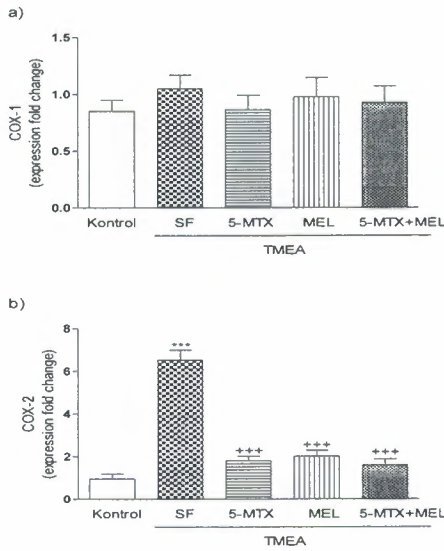
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ Kontrol grubuna göre karşılaştırmalar,

+++ $p < 0.001$ TMEA grubuna göre karşılaştırmalar.

^δ $p < 0.05$ MEL grubuna göre yapılan karşılaştırmalar.

Tablo 4.3: Sıçanlarda yapılan temporomandibular eklem artrit modelinde (TMEA), tüm gruplara ait doku siklooksijenaz-1 (COX-1) ve COX-2 aktiviteleri. MEL: Melatonin, 5-MTX: 5-Metoksitriptofol.

	Kontrol	TMEA	TMEA-5-MTX	TMEA-MEL	TMEA-MEL+5-MTX
COX-1 (expression fold change)	0.85 ± 0.09	1.05 ± 0.12	0.86 ± 0.13	0.97 ± 0.17	0.93 ± 0.14
COX-2 (expression fold change)	0.95 ± 0.24	6.52 ± 0.45 ***	1.80 ± 0.21 +++	2.01 ± 0.27 +++	1.59 ± 0.28 +++



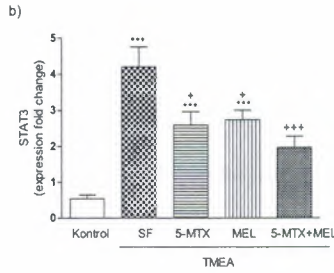
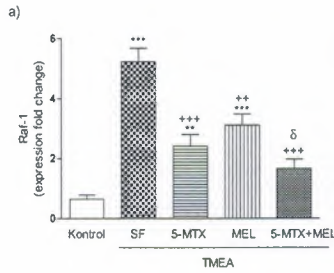
Şekil 4.3: Sıçanlarda yapılan temporomandibular eklem artrit (TMEA) modelinde tüm gruplara ait doku siklooksijenaz-1 (COX-1) ve COX-2 aktiviteleri. MEL: Melatonin, 5-MTX: 5-Metoksitriptofol.

*** p<0.001 Kontrol grubuna göre karşılaştırmalar,

+++ p<0.001 TMEA grubuna göre karşılaştırmalar.

Tablo 4.4: Sıçanlarda yapılan temporomandibular eklem artrit (TMEA) modelinde tüm gruplara ait doku *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma-1* (Raf-1) ve *Signal Transducer and Activator of Transcription3* (STAT3) düzeyleri. MEL: Melatonin, 5-MTX: 5-Metoksitriptofol.

	Kontrol	TMEA	TMEA-5-MTX	TMEA-MEL	TMEA-MEL+5-MTX
Raf-1 (expression fold change)	0.65 ± 0.14	5.23 ± 0.45 ***	2.41 ± 0.39 **, +	3.11 ± 0.38 ***, ++	1.66 ± 0.32 ***, ^δ
STAT-3 (expression fold change)	0.54 ± 0.11	4.20 ± 0.55 ***	2.59 ± 0.37 ***, +	2.74 ± 0.27 ***, +	1.96 ± 0.32 ***

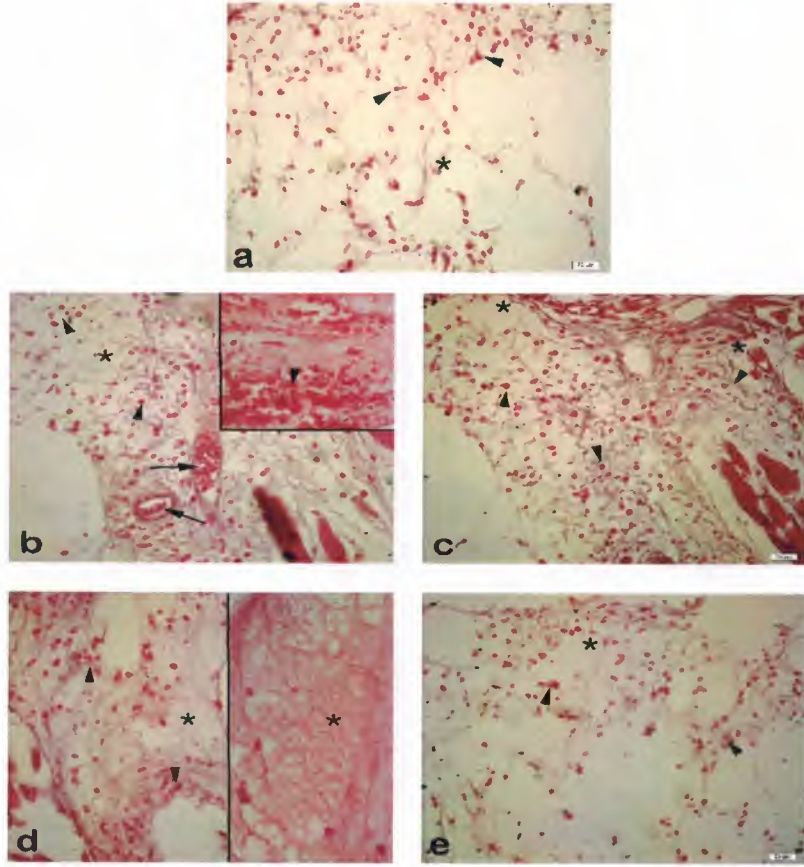


Şekil 4.4: Sıçanlarda yapılan temporomandibular eklem artrit (TMEA) modelinde tüm gruplara ait doku *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma-1* (Raf-1) ve *Signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) düzeyleri. MEL: Melatonin, 5-MTX: 5-Metoksitriptofol.

** p<0.01, *** p<0.001 Kontrol grubuna göre karşılaştırmalar,

+ p<0.05, ++ p<0.01, +++ p<0.001 TMEA grubuna göre karşılaştırmalar.

^δ p<0.05 MEL grubuna göre yapılan karşılaştırmalar



Şekil 4.5: Sinoviyal dokudaki histolojik inceleme.

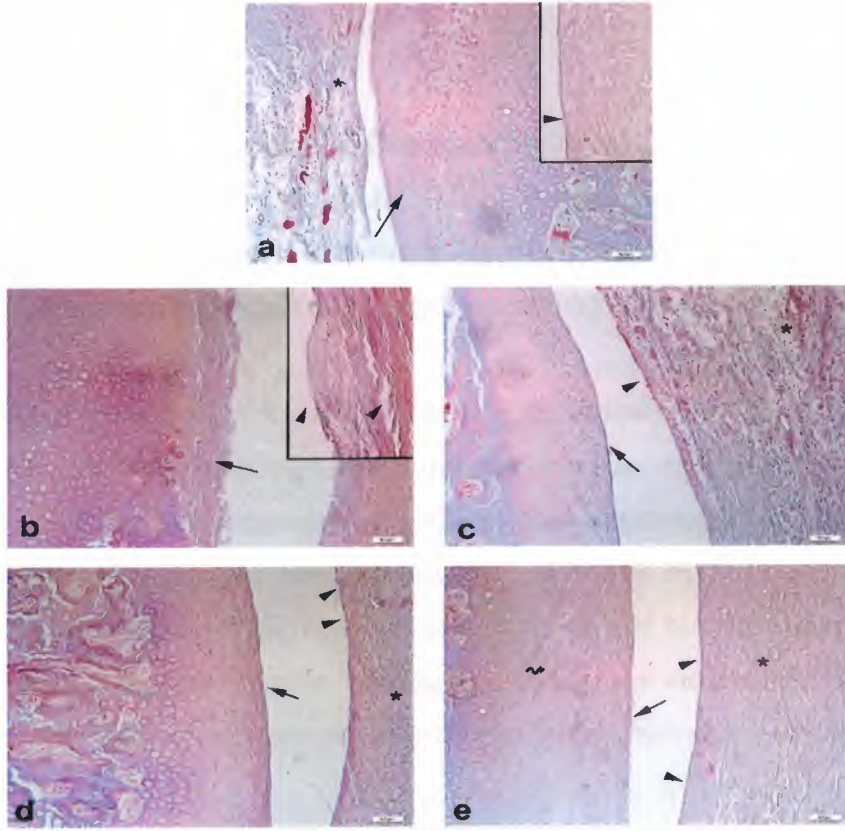
a) Kontrol grubu: Sinoviyal membranda dağılmış morfolojiyle gözlenen sinoviositler (okbaşları), sinoviyal doku (*),

b) Temporomandibular eklem artrit (TMEA) grubu: Yoğun kapiler konjesyon (oklar) ve sinoviositler (okbaşları), yoğun sinoviyal doku (*),

c) TMEA + 5-Metoksitriptofol (5-MTX) grubu: Kapiler konjesyonda ve sinoviosit yoğunluğunda (okbaşları) ılımlı gerileme,

d) TMEA + Melatonin (MEL) grubu: Kapiler konjesyonda gerileme yanısıra sinoviosit yoğunluğunda oldukça belirgin gerileme (okbaşları) sinoviyal dokuda hücre yoğunluğu (*),

e) TMEA + MEL + 5-MTX grubu: Sinoviyanın (*) belirgin biçimde azalan sinoviosit yoğunluğu (okbaşları).



Şekil 4.6 : Kartilaj dokusundaki histolojik inceleme.

a) Kontrol grubu: Normal artiküler kartilaj (ok) ve disk(*), perikondrium (okbaşı),

b) Temporomandibular eklem artrit (TMEA) grubu: Kartilajda yıkım (ok), perikondrial dejenerasyon mevcut (ok başı),

c) TMEA + 5-Metoksitriptofol (5-MTX) grubu: Kartilaj (ok), artiküler disk yüzeyi (okbaşı) ve bağ dokusu (*) dejenerasyonunda azalma, hipertrofik kondrosit mevcut,

d) TMEA + Melatonin (MEL) grubu: Kartilaj (ok), artiküler disk yüzeyi (okbaşı) ve bağ dokusu (*) dejenerasyonunda azalma, hipertrofik kondrosit mevcut,

e) TMEA + MEL + 5-MTX grubu Kartilaj (ok), artiküler disk yüzeyi (okbaşı) ve bağ dokusu (*) dejenerasyonunda azalma, azalmış hipertrofik kondrosit mevcut (kıvrık ok).

5. TARTIŞMA

Artrit nedeniyle oluşan inflamasyon toplumun her kesiminde insanları etkileyen ciddi bir sağlık problemidir. Özellikle temporomandibular ekleme bağlı ortaya çıkan inflamasyonun tedavisinde birçok uygulama ve pek çok çalışma yapılmasına rağmen bu konuda halen başarıya ulaşıldığı söylenemez.

Ağrı, çene hareketlerinde kısıtlılık, klik, krepitasyon ve hassasiyet ile karakterize temporomandibular eklem rahatsızlıklarının oluşması birçok faktöre bağlıdır. Hasarın oluşmasında, nötrofiller, monosit/makrofajlar, trombositler, kompleman ve koagülasyon sistemi, sitokinler, proteolitik enzimler, araşidonik asit yolağı, mitojen aktive protein kinaz (MAPK) kaskadı gibi birçok mediyatörün rolü olduğu düşünülmektedir (Kanbe ve diğerleri, 2016). Bu mediyatörler çoğunlukla sinoviyal alan dahil olmak üzere tüm dokuda yapısal tahribata neden olmaktadır.

Çalışmamızda TMEA oluşturmak için kullandığımız maya hücre duvarından sentezlenen bir polisakkarit olan zymosanın vasküler permeabilitede ve hücre migrasyonunda artışa neden olduğu böylece mononükleer hücre infiltrasyonu ile birlikte sinovitin meydana geldiği ve kondilin artiküler yüzeyinde dejenerasyon başlattığı ve böylece RA oluşturduğu bir çok çalışmada gösterilmiştir (Keystone ve diğerleri, 1977; Gegout ve diğerleri, 1994; Rocha ve diğerleri, 1999). Bu çalışmalarda zymosanın inflamasyon modellerinde 0.25, 0.5, 1 ya da 2 mg'lık dozları denenip değişik zaman dilimlerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Çalışmamızda zymosanın 2 mg'lık enjeksiyonundan 6 saat sonra yoğun inflamasyona neden olduğu görülmüştür. Bu bulgu literatüre uygunluk sağlamaktadır.

Belenska-Todorova ve diğerleri (2015), zymosan ile oluşturulmuş deneysel inflamasyon modelinde sinoviyal sıvıda nötrofil infiltrasyonu ile birlikte TNF- α ve IL-1 β düzeylerinin arttığını belirtmişlerdir. Suzuki ve diğerleri (2002) de 31 artritli hasta üzerinde yapmış oldukları klinik çalışmada sinoviyal sıvıdaki TNF- α ve IL-1 β gibi sitokinlerin, fibroblastlardaki tip 1 kollajenin sentezini artırdığını, metalloproteazların

aktivasyonuna neden olduğunu ve böylece inflamasyondaki etkinliklerini göstermişlerdir.

Benzer şekilde bizim çalışmamızda da zymosan ile oluşan inflamasyon sonucunda sinoviyal sıvıda TNF- α ve IL-1 β gibi sitokinlerde artış görülmüştür. Bilindiği gibi proinflamatuvar sitokinlerin artışı organizmada bir inflamatuvar yanıtın oluştuğuna işaret etmektedir ki inflamasyon da dokularda hasara yol açan önemli bir başlangıçtır (Kanbe ve diğerleri, 2016). Çalışmamızda kullandığımız tedavi ajanlarının doku parametreleri üzerindeki olumlu etkileri göz önüne alındığında bu ajanların sinoviyal sıvıda sitokin düzeylerini de anlamlı olarak baskılamış olmaları temporomandibular eklemden görülen inflamasyonda bu sitokinlerin önemli rolünü desteklemektedir. Dolayısıyla TMEA tedavisinde kullanılan ajanların sitokin ekspresyonları üzerinde inhibitör özelliklerinin olması tedavinin başarısını artıracaktır.

Liu ve diğerleri (2013) MEL'in mezenşimal kök hücrelerinde IL-1 β 'nin neden olduğu inflamasyonu önleyerek kemik rejenerasyonuna katkıda bulunduğunu göstermişlerdir.

Melatoninin antioksidan ve antiinflamatuvar etkilerinin çalışıldığı başka bir artrit modelinde ise bu ajanın TNF- α ve IL-1 β düzeylerini azalttığı gösterilmiştir (Forrest ve diğerleri, 2007).

Diğer bir pineal indol olan 5-MTX'in de antioksidan etkileri incelenmiştir (Satué ve diğerleri, 2015). Ancak inflamasyon ile ilgili çalışmalar yeterli olmamasına rağmen immunomodülatör etkisiyle antiinflamatuvar sitokin olan IL-2 düzeyini serumda artırdığı proinflamatuvar sitokin olan IL-6'yı ise azalttığını Lissoni ve diğerleri (2012) tarafından gösterilmiştir.

Tüm bu çalışmalar dikkate alındığında bizim bulgularımızın bu araştırmalarla uygunluk sağladığı, MEL ve 5-MTX'in proinflamatuvar sitokinler üzerindeki inhibitör etkilerinin doku koruyucu etkilere aracılık ettiği çalışmamızda gösterilmiştir. Ancak

5-MTX'in TNF- α ve IL-1 β gibi sitokinler üzerine etkisine ait çalışma literatürde rastlanmamıştır.

Matriks metalloproteinazlar (MMP'ler), bir çinko bağımlı metalloendopeptidazlar ailesi olup, epitelyal, mezenkimal ve hematopoetik hücrelerde eksprese olmakta ve kollejenaz, stromelizin, jelatinaz, membran-tip ve diğerleri olmak üzere 5 alt gruptan oluşmaktadır (Xue ve diğerleri, 2007). Yapılan deneysel ve klinik çalışmalar inflamasyon ve bağ dokusu hastalıklarında, jelatinaz alt familyasından oluşan MMP-2 (jelatinaz A) ve MMP-9 (jelatinaz B)'un önemli rol oynadığını göstermektedir (Clegg ve diğerleri, 1997; Pakozdi ve diğerleri, 1997).

Pakozdi ve diğerleri (2006), MMP-2'nin inflamasyonda etkinliğini araştırmak için gerek zymosan gerekse makrofaj migrasyon inhibitör faktör ile yaptığı deneysel inflamasyon modellerinde bu proteolitik enzimin aktivasyonunun arttığını göstermişlerdir.

Kolaczowska ve diğerleri (2009), zymosan ile oluşturduğu deneysel peritonit modelinde mast hücrelerinde, makrofaj ve nötrofillerde MMP-9 ekspresyonunun arttığını belirtmişlerdir. Dolayısıyla bu MMP'ler çeşitli hücre ve dokularda spesifik peptid bağlarını parçalayarak ekstraselüler matriks proteinini yıkmak suretiyle etkinlik gösterip romatoid artrit, tümörün invazyonu, apoptoz ve anjiogenez gibi patolojik durumlarda rol oynamaktadır (Cunnane ve diğerleri, 2001).

Çalışmamızda bulduğumuz sonuçlar yukarıdaki çalışmalar ile paralellik göstermektedir. Zymosan uygulaması neticesinde sinoviyal sıvıda MMP-2 ve MMP-9 aktivasyonu kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmış, MEL ve 5-MTX uygulamalarıyla anlamlı olarak normale yaklaşmıştır.

Melatoninin MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonu üzerine etkileri spinal kord hasarı (Esposito ve diğerleri, 2008a), kolit (Esposito ve diğerleri, 2008b), serebral iskemi (Kim ve diğerleri, 2014) gibi birçok inflamasyon modellerinde çalışılmıştır. Bu modellerde MEL'in antioksidan ve antiinflamatuvar özellikleri ile MMP-2 ve MMP-9

ekspresyonunu azaltarak koruyucu etkisinin olduğu gösterilmiştir. Ancak hiçbir artrit modelinde MEL'in MMP-2 ve MMP-9 aktivasyonu üzerine etkisi çalışılmamıştır.

Tedavide kullandığımız diğer ajan 5-MTX'in ise bugüne kadar yapılan çalışmalarda reaktif oksijen düzeylerini azaltarak doku proliferasyonunu sağladığı belirtilmiştir (Millan-Plano ve diğerleri, 2010).

Gomez-Florit ve diğerleri (2013) periodontal hastalıklarda 5-MTX'in alveolar kemik kaybını antioksidan özellikleri ile önlediğini göstermişlerdir. Ancak bugüne kadar 5-MTX'in proteolitik enzimler üzerine etkisi araştırılmamış olup bizim çalışmamızla ilk olmaktadır.

Siklooksijenaz (COX) enzimleri, hücre içerisinde inflamasyonda rol oynayan maddelerin oluşumunda görevli enzimlerdir. İyi bilinen iki tip izoformu mevcuttur. Konstitütif siklooksijenaz (COX -1) ve indüklenebilir siklooksijenaz (COX-2). COX-1 çoğu hücrede normal koşullarda yüksek seviyede olup salgılattığı mediyatörler aracılığı ile trombosit aktivasyonunda, vazokonstriksiyonda, düz kas hücre proliferasyonunda rol oynarken COX-2 enzimleri ise fizyolojik şartlarda düşük olup TNF- α ve IL-1 β gibi sitokinlerle, proteazlarla, endotoksinlerle birlikte seviyesi artmakta, vazodilatasyonda, inflamasyonda, ağrıda ve ateşte rol oynamaktadır (Hanafy ve diğerleri, 2012).

Deneysel artrit çalışmalarında, COX-1 yolağının değil COX-2 yolağının aktive olduğu gösterilmiştir. Özellikle Seki ve diğerleri (2004), temporomandibular eklemden osteoartrit ve internal düzensizlik görülen 10 hasta ve 3 sağlıklı kişi ile yaptığı klinik çalışmada COX-1 düzeylerinin sinoviyum da gerek sağlıklı gerekse hasta gruplarında değişmediği ancak COX-2 aktivasyonunun hasta olan gruplarda anlamlı olarak arttığını belirtmişler ve böylece artrit, kondrositlerin büyümesinde, osteoklastik kemik rezorpsiyonunun artmasında COX-2 aktivasyonunun önemini vurgulamışlardır.

Bizim çalışmamızda da bulduğumuz sonuçlar bu çalışmalarla ile uyum göstermektedir. Zymosan uygulayıp TMEA oluşturduğumuz grupta COX-1 aktivasyonu kontrol grubuna göre değişmemiş, COX-2 düzeyleri ise kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmıştır. Tedavi uyguladığımız gruplarda ise bu değişiklik anlamlı olarak düzelmiştir.

Klinik ve deneysel çalışmalarda pineal indol hormon olan MEL'in multiple skleroz, ülseratif kolit, sistemik lupus eritematozus, tip 1 diabetes mellitus gibi inflamasyona neden olan hastalıklarda, COX-2 aktivasyonunu önleyerek antiinflamatuvar etki gösterdiği belirtilmiştir (Lin ve diğerleri, 2013).

Cutando ve diğerleri (2007) yaptıkları çalışmada, melatoninin hem COX-1 hem de COX-2 enzimlerine güçlü afinite gösterse de alveolar sokete lokal olarak uygulandığında diş çekim esnasında görülen inflamasyonu sadece COX-2 aktivasyonunu önleyerek gerçekleştirdiğini belirtmişlerdir. Bu durum bizim sonuçlarımızla örtüşmekte ve MEL'in diş hekimliğinde önemli fizyolojik rolü olmadığı iddia edilse de bakteriyel ve viral kökenli oral kavite hastalıklarında, ameliyat sonrası yara iyileşmelerinde, oral ameliyatlarda kemik dokusunun oluşumunda, Sjogren sendromu gibi otoimmün rahatsızlıklarda, periodontal hastalıklarda, aftöz ülserasyonda, liken planusda ve oral kanserlerde koruyucu amaçla kullanılması önerilmektedir (Cengiz ve diğerleri, 2012).

5-metoksitriptofol'un COX aktivitesini direkt etkilemesi üzerine yapılmış çalışma literatürde rastlanılmamıştır. Ancak melatoninin yıkımlanma ürünü olması sebebiyle dolaylı olarak antiinflamatuvar etkisi belirtilmiş yine de COX üzerine etkisi saptanmamıştır. Dolayısıyla çalışmamız aydınlık ve karanlık döngüsüne göre salıverilmesi değişkenlik gösteren bu iki pineal indolün (MEL ve 5-MTX) eksojen uygulamasının TMEA ile ilgili araştırmalarda ilk olması ve etki mekanizmaları doğrultusunda yeni bir tedavi prensibi oluşturabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda Real Time-PCR ile değerlendirdiğimiz *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma-1* (Raf-1), serin/treonin spesifik protein kinaz ailesinden olup mitojen

aktive protein kinaz (MAPK) yolağının aktivasyonuna yol açmakta, mitojenle etkileşen protein kinaz (MEK) ve ekstraselüler regüle edici kinaz (ERK) düzeylerini artırarak proliferasyona, farklılaşmaya, antiapoptotik etkisiyle tümör oluşumuna, anjiyogenezise ve inflamasyona neden olmaktadır. Özellikle Raf-1'in neden olduğu inflamasyonda MAPK yolağı kadar nükleer faktör- κ B (NF- κ B) yolağı da önemli rol oynamaktadır. Zira NF- κ B'nin aktivasyonu ile TNF- α ve IL-1 β gibi sitokinlerin düzeyleri yükselmektedir (Cinel, 2003).

Yeung ve diğerleri (2001) yaptıkları çalışmada Raf-1 inhibitör proteinin MAPK ve NF- κ B yollarının aktivasyonunu engellediğini göstermişlerdir.

Lin ve diğerleri (2013) Raf-1 inhibitörü GW 5074 maddesinin akciğer epitel hücrelerinde inflamasyonu önlediğini belirtmişlerdir. Yapılan tüm bu çalışmalar Raf-1'in inflamasyonda ki önemini göstermektedir.

Temporomandibular eklem artritinde ise Raf-1'in rolü ile ilgili çalışma rastlanmamıştır. Ancak romatoid artrit üzerine yapılan çalışmalar bu hastalığın patogenezinde Raf-1'in etkinliğini göstermektedir. Çalışmamızda ise TMEA'da eklem dokusunda Raf-1 aktivasyonu yükselmiş ve sinoviyal sıvıdaki TNF- α ve IL-1 β düzeylerinin artışıyla paralellik göstermiştir. MEL ve 5- MTX tedavisi sonucunda ise Raf-1 aktivasyonundaki artış normale dönmüştür. Gerek MEL'in gerekse 5-MTX'in Raf-1'in aktivasyonu ile ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır. Ancak yapılan MEL'le ilgili sadece iki çalışma bulunmakta ve bunlarda melatoninin Raf-1'in antiapoptotik özelliğini aktive ederek hepatik ve serebral iskemi modellerinde koruyucu etkisi olduğu iddia edilmiştir (Gim ve Koh, 2015; Koh, 2008).

Bu sonuçlar bizim sonuçlarımızla çelişse de başka parametrelerle bu çalışmaların desteklenmemiş olması melatoninin antiinflamatuvar mekanizmasını tam olarak açıklayamamaktadır. Dolayısıyla çalışmamız bu açıdan da değerlendirildiğinde TMEA'nın patogenezinin açıklamakta bir ışık olacak ve değişik tedavi yöntemlerinin arayışına sebep olacaktır.

“*Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT)*” proteinleri interferon (IFN) aracılı gen transkripsiyonunun düzenlenmesi ile birlikte tanımlanmış olup, STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b ve STAT6 olmak üzere yedi alt birimden oluşmakta, proliferasyona, migrasyona ve inflamasyona neden olmaktadır. (Doğan ve Güç, 2004). Özellikle inflamasyonda STAT3 proteinleri önemli rol oynamaktadır (Abroun ve diğerleri, 2015).

Yapılan bir çalışmada inflamasyon esnasında IL-1 β , IL-4 IL-5, IL-6, IL-11 gibi sitokinlerin, makrofaj koloni sitmüle edici faktörün trombosit kaynaklı büyüme faktörünün, interselüler adhezyon molekülü-1’in (ICAM-1), vasküler hücre adhezyon molekülü-1’in (VCAM-1) ve kemik morfogenetik-2’nin (BMP-2) ekspresyonundaki artışın STAT3 yolağını aktive ettiği gösterilmiştir (Lee ve diğerleri, 2016).

STAT3 protein düzeyindeki yükselişin gerek MAPK yolağını aktive ederek gerekse TNF- α , IL-6 gibi sitokinlerin düzeyleri ile MMP-2 ile MMP-9 proteolitik enzimlerinin aktivasyonunu artırarak serbest oksijen radikalleri ile birlikte inflamasyonu hızlandırdığı belirtilmiştir (Tchaparian ve diğerleri, 2010).

Temporomandibular eklem artritinde STAT3 proteinlerinin sitokin aktivasyonu ile ilişkisi arasında 1999 yılında yapılan tek bir çalışmada sığır temporomandibular eklem disk hücre kültüründe STAT3 proteini ile sitokinler arasında bir korelasyon saptanmamış olmasına rağmen daha sonra yapılan romatoid artrit çalışmalarında bu hipotez çürütülmüştür. Nitekim Yang ve diğerleri (2016), romatoid artritli 28 hasta üzerinde yaptıkları çalışmada, fibroblast benzeri hücre kültüründe IL-34/STAT3/microRNA 21 (miR-21) yolağının inflamasyonun patogeneğinde önemli rol oynadığını göstermişlerdir.

Lee ve diğerleri, (2016) kollajen aracılı artrit modelinde eklem dokusunda ki STAT3 proteini artışının osteoklastik aktiviteyi arttırdığını ifade etmişlerdir. Çalışmamızda ise TMEA yapılan grupta eklem dokusunda STAT3 protein

ekspresyonunda artış olmuş ve bu durum ile birlikte sinoviyal sıvıda hem sitokin hem de proteolitik enzimlerin düzeyinde yükselme gözlenmiştir. Dolayısıyla bu sonuçlar literatüre uygunluk göstermiş MEL ve 5-MTX ile yapılan tedavide bu parametrelerde ki değişiklik anlamlı olarak düzelmiştir.

Melatoninin koruyucu etki mekanizmasını aydınlatmak üzere yapılan çalışmalarda gerek karaciğer dokusunda gerekse kalp dokusunda STAT3 proteininin antiapoptotik etkisi ile rejenerasyonu sağladığı iddia edilmiş ancak Min ve diğerleri (2012) de mikroglia hücrelerinde lipopolisakkarit uygulayarak yaptıkları inflamasyon modelinde bu hücrelerde STAT3 ekspresyonunun sitokinlerle birlikte arttığını ve böylece doku hasarına neden olduğunu, melatonin uygulaması ile bu hasarın düzeldiğini belirtmiş ve farklı bir sonuca varmıştır.

Bizim çalışmamız Min ve diğerlerinin (2012) yaptıkları çalışma ile uyumludur. Çalışmamızda kullandığımız 5-MTX'in STAT3 protein üzerinde literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır ancak bizim sonuçlarımızda eklem dokusunda STAT3 proteini düzeylerinin baskılanması aydınlıkta salıverilen bu pineal indolün antiinflamatuvar etki mekanizmasını açıklamakta yardımcı olmaktadır.

Histolojik olarak bulgularımızı değerlendirdiğimizde TMEA grubunda sinoviyal membranda sinoviosit yoğunluğunda artış ve kapiler konjesyon ile belirgin hasar görülürken kondil dokusunda artiküler dejenerasyon ve diskte konjesyon saptanmıştır. Yapılan çalışmada bu TMEA'da yapısal hasarın oluşmasında COX-2 düzeylerinin artışı ile birlikte diğer proinflatuar sitokinlerin ve proteolitik enzimlerin de yükselmesinin eşlik ettiği belirtilmiştir (Crofford, 1999). Bizim bulgularımız da bu araştırmayla paralellik göstermektedir. Tedavi amacıyla kullandığımız, MEL ve 5-MTX gruplarında ise sinoviyal membranda konjesyon gerilemekle birlikte hücre yoğunluğu azalması olurken kondil dokusunda ise artiküler dejenerasyonda azalma gözlenmiştir. Bu sonuçlar çalışmamızda değerlendirdiğimiz diğer biyokimyasal parametrelerle birlikte literatüre uygunluk göstermektedir.

Çalışmamızın tüm bulguları eşliğinde, uyguladığımız deneysel model ile temporomandibular eklem artritinin inflamatuvar bir hastalık olduğu, sinoviyal sıvıda proinflamatuvar sitokinler ile proteolitik ezimlerin arttığı COX, MAPK ve STAT3 yolları ile doku hasarı geliştiği gözlenmiştir. Bu olumsuz yöndeki değişikliklere sinoviyal membran ve kondil dokusunda yapılan histolojik incelemelerle de yapısal hasarın eşlik ettiği görülmüştür.

Literatürde de takip ettiğimiz gibi bu kadar faktörün rol oynadığı bir durumda alternatif tedavi prensiplerine arayışlar halen sürmektedir. Doğal olarak öncelikle temeldeki nedenlere yönelik uygulamalar ilk sıralarda yer almalıdır. Ancak bu inflamatuvar hastalığın komplikasyonlarının önlenmesi de amaçlardan bir diğeri olduğuna göre tedaviye yan etki potansiyeli az olan daha önce temporomandibular eklem artritinde hiç denenmemiş ve bu yönde ilk çalışma olan karanlığın hormonu MEL ile aydınlıkta salıverilen 5-MTX'in eksojen uygulanması sonuçların daha başarılı olmasını sağlayacaktır. Ayrıca 5-MTX ve MEL'in antikolinergik etkiye sahip olması salgı azaltmak için kullanılan atropinin de yerini alabileceğini düşündürmektedir. Yine de bu ajanların klinikte kullanılabilmesi için daha geniş karşılaştırmalı deneysel ve klinik çalışmalara ihtiyaç olup daha sonraki çalışmalara ışık tutacağı inancındayız.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Araştırmada aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır:

1. Temporomandibular eklem artrit yapılan grupta sinoviyal sıvıya ait TNF- α , IL-1 β , MMP-2 ve MMP-9 düzeyleri yükselmiştir buna karşılık MEL, 5-MTX ve MEL+5-MTX uygulanan TMEA gruplarında ise SF uygulanan TMEA grubundaki artış düşmüştür.
2. Temporomandibular eklem artrit yapılan grupta eklem ait COX-2 düzeyleri yükselmiştir. Buna karşılık MEL, 5-MTX ile MEL+5-MTX uygulanan TMEA gruplarında ise SF uygulanan TMEA grubundaki artış düşmüştür.
3. Temporomandibular eklem artrit yapılan grupta eklem ait Raf-1 ve STAT-3 düzeyleri yüksek bulunmuştur. Buna karşılık MEL, 5-MTX ile MEL+5-MTX uygulanan TMEA gruplarında ise SF uygulanan TMEA grubundaki artış düşmüştür.
4. Sinoviyal dokuda yapılan histolojik incelemelerde TMEA grubu sinoviosit yoğunluğunda artış ve kapiler konjesyon ile belirgin hasar göstermiştir. MEL, 5-MTX ile MEL+5-MTX uygulanan TMEA gruplarında ise konjesyon gerilemekle birlikte hücre yoğunluğu azalarak devamlılık göstermiştir.
5. Mandibular kondilde yapılan histolojik incelemelerde TMEA grubunda artiküler dejenerasyon ve diskte konjesyon saptanmıştır. MEL, 5-MTX ile MEL+5-MTX uygulanan TMEA gruplarında ise artiküler dejenerasyonda azalma tespit edilmiştir.

Aldığımız bu sonuçlar ışığında sirkadiyen ritmin düzenlenmesinde rol oynayan antioksidan ve antiinflamatuvar etkili MEL ve 5-MTX'in RA tedavisinde yapılan rutin uygulamalara istinaden alternatif bir tedavi olabileceğini düşünmekteyiz ancak bu iki ajanın klinikte kullanılabilmesi için geniş kapsamlı deneysel ve klinik çalışmaların yapılması önerilir.

KAYNAKLAR

Abboud, W. A., Givol, N. ve Yahalom, R., (2015). Arthroscopic lysis and lavage for internal derangement of the temporomandibular joint. *Annals of Maxillofacial Surgery*, 5:2.

Abroun, S., Saki, N., Ahmadvand, M., Asghari, F., Salari, F. ve Rahim, F., (2015). STATs: an old story, yet mesmerizing. *Cell Journal*, 17(3): 395–411.

Akkoç, N. ve Akar, S. (2006). Epidemiology of Rheumatoid Arthritis in Turkey. *Clinical Rheumatology*, 25: 560–561.

Alebouyeh, M., Takeda, M., Onozato, M. L., ve diğerleri, (2003). Expression of human organic anion transporters in the choroid plexus and their interactions with neurotransmitter metabolites. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93(4): 430–436.

Atsu, S. S. ve Ayhan-Ardic, F., (2006). Temporomandibular disorders seen in rheumatology practices: A review. *Rheumatology International*, 26: 781-787.

Balemans, M. G., Pévet, P., Legerstee, W. C. ve Nevo, E., (1980). Preliminary investigations of melatonin and 5-methoxy-tryptophol synthesis in the pineal, retina, and hardierian gland of the mole rat and in the pineal of the mouse 'eyeless'. *Journal of Neural Transmission*, 49(4): 247–255.

Belenska-Todorova, L., Gyurkovska, V. ve Ivanovska, N., (2015). How complement activation influences the development of chronic synovitis in a mouse model of rheumatoid arthritis. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 1–10.

Borges Lda, S., Dermargos, A., da Silva Junior, E. P., Weimann, E., Lambertucci, R. H. ve Hatanaka, E., (2015). Melatonin decreases muscular oxidative stress and inflammation induced by strenuous exercise and stimulates growth factor synthesis. *Journal of Pineal Research*, 58(2): 166-172.

Braunwald, E., Isselbacher, K. J., Petersdorf, R. G. ve diğerleri, (1987). *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 11th. ed. New York: McGraw-Hill.

Bumann, A. ve Lotzmann, U., (2002). *TMJ disorders and orofacial pain, the role of dentistry in a multidisciplinary diagnostic approach*. Stuttgart: New York Thieme.

Cacalano, N. A., (2016). Regulation of natural killer cell function by STAT3. *Frontiers in Immunology*, 7: 128.

Celiker, R., Gokce-Kutsal, Y. ve Eryilmaz, M., (1995). Temporomandibular joint involvement in rheumatoid arthritis. Relationship with disease activity. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 24: 22-25.

Cengiz, M. İ., Cengiz, S ve Wang, H. L., (2012). Melatonin and oral cavity. *International Journal of Dentistry*, 2012: 491872.

Chaves, H. V., Ribeiro, R. A., Souza, A. M. B., Silva, A. A. R., Gomes, A.S., Vale, M. L., v (2011). Experimental model of zymosan-induced arthritis in the rat temporomandibular joint: role of nitric oxide and neutrophils. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011: 707985.

Cinel, İ. (2003). Sepsiste patojenik mekanizmalar. *Yoğun Bakım Derneği Dergisi*, 1(4).

Clegg, P. D., Burket, R. M., Coughlans, A. R., Rlggs, C. M. ve Carter, S. D. (1997). Characterisation of equine matrix metalloproteinase 2 and 9; and identification of the cellular sources of these enzymes in joints. *Equine Veterinary Journal*, 29(5): 335-342.

Crofford, L. J., (1997). COX-2 in synovial tissues. *Osteoarthritis and Cartilage*, 7: 406–408.

Cunnane, G., FitzGerald, O., Hummel, K. M., Youssef, P. P., Gay, R. E., Gay, S. ve diğerleri, (2001). Synovial tissue protease gene expression and joint erosions in early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatology*, 44: 1744–1753.

Cutando, A., Arana, C., Gómez-Moreno, G. ve diğerleri, (2007). Local application of melatonin into alveolar sockets of beagle dogs reduces tooth removal-induced oxidative stress. *Journal of Periodontology*, 78(3):576–583.

Cutolo, M. ve Maestroni G.J.M., (2005). The melatonin-cytokine connection in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 64: 1109–1111.

Cuzzocrea, S. ve Reiter, R. J. (2002). Pharmacological actions of melatonin in acute and chronic inflammation. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2: 153-165.

Cuzzocrea, S. ve Reiter, R. J., (2001). Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. *European Journal of Pharmacology*, 426(1-2): 1-10.

Dayer, J. M., (2004). The process of identifying and understanding cytokines: from basic studies to treating rheumatic diseases. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 18(1):31-45.

De Leeuw, R., (2008). Orofacial pain: guidelines for assessment, diagnosis and management. *American Academy of Orofacial Pain*, p. 316.

De Riu, G., Stimolo, M., MarioMeloni, S., Soma, D., Pisano, M., Sembronio, S. ve Tullio, A., (2013). Arthrocentesis and temporomandibular joint disorders: clinical and radiological results of a prospective study. *International Journal of Dentistry*, 2013: 790648.

Deigner, H. P., Haberkorn, U. ve Kinscherf, R., (2000). Apoptosis modulators in the therapy of neurodegenerative diseases. *Expert Opinion Investigational Drugs*, 9(4):747-64.

Dijkgraaf, L. C., de Bont, L.G., Boering, G. ve Liem, R. S., (1996). Structure of the normal synovial membrane of the temporomandibular joint: a review of the literature. *Journal of Oral Maxillofacial Surgery*, 54(3): 332-8.

Doğan, A.L. ve Güç, D., (2004). Sinyal iletim mekanizmaları ve kanser. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 35: 34-42.

Dong, W. G., Mei, Q., Yu, J. P., Xu, J. M., Xiang, L. ve Xu, Y., (2003). Effects of melatonin on the expression of iNOS and COX-2 in rat models of colitis. *World Journal of Gastroenterology*, 9(6):1307-1311.

Dutzmann, J., Daniel, J.M., Bauersachs, J., Hilfiker-Kleiner, D. ve Sedding, D.G., (2015). Emerging translational approaches to target STAT3 signalling and its impact on vascular disease. *Cardiovascular Research*, 106(3):365-74.

Ed, H., (1990). Rheumatoid arthritis: pathophysiology and implications for therapy. *The New England Journal of Medicine*, 322: 1277–1289.

Esposito, E., Genovese, T., Caminiti, R., Bramanti, P., Meli, R. ve Cuzzocrea, S., (2008). Melatonin regulates matrix metalloproteinases after traumatic experimental spinal cord injury. *Journal of Pineal Research*, 45: 149–156.

Esposito, E., Mazzone, E., Riccardi, L., Caminiti, R., Meli, R. ve Cuzzocrea, S., (2008). Matrix metalloproteinase-9 and metalloproteinase-2 activity and expression is reduced by melatonin during experimental colitis. *Journal of Pineal Research*, 45: 166–173.

Ferguson, S.A., Rajaratnam, S. M. ve Dawson, D., (2010). Melatonin agonists and insomnia. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 10: 305-318.

Fernando, I. N., Francis, P. L. ve Smith, I., (1983). Acyltryptophols reversibly inhibit muscle contractions caused by the actions of acetylcholine and raised potassium ion concentrations. *Journal of Neural Transmission*, 56: 33-41.

Field, A., Longman, L. ve Tyldesley, W. R., (2008). *Tyldesley's Oral Medicine*. England: Oxford Medical Publications.

Forrest, C. M., Mackay, G. M., Stoy, N., Stone, T. W. ve Darlington, L. G., (2007). Inflammatory status and kynurenine metabolism in rheumatoid arthritis treated with melatonin. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 64(4): 517–526.

Gegout, P., Gillet, P., Chevrier, D., Guingamp, C., Terlain, B. ve Netter, P., (1994). Characterization of zymosan-induced arthritis in the rat: effects on joint inflammation and cartilage metabolism. *Life Science*, 55(17): 321-6.

Gim, S. A. ve Koh, P. O., (2015). Melatonin attenuates hepatic ischemia through mitogen-activated protein kinase signaling. *Journal of Surgical Research*, 198(1): 228-236.

Gomez-Florit, M., Ramis, J. M. ve Monjo, M., (2013). Anti-fibrotic and anti-inflammatory properties of melatonin on human gingival fibroblasts in vitro. *Biochemical Pharmacology*, 86: 1784-1790.

Görür, D. İ. (2009). *Temporomandibuler Eklemdede (TME) Disk Deplasmanlarının Düşük Enerji Seviyeli Laser ile Tedavisinin Subjektif ve Objektif Olarak Değerlendirilmesi*. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.

Grace, M. S., Cahill, G. M. ve Besharse, J. C., (1991). Melatonin deacetylation: retinal vertebrate class distribution and *Xenopus laevis* tissue distribution. *Brain Research*, 559(1): 56-63.

Gray, R. I. M., Davies, S. J. ve Quayle, A.A., (1994). Temporomandibular disorders: Examination of the articulatory system. *British Dental Journal*, 9(1):25-28.

Griffin, C. J. ve Harris, R., (1975). Innervation of the temporomandibular joint. *Australian Dental Journal*, 78-85.

Gynther, G. W. ve Holmlund, A. B., (1998). Efficacy of arthroscopic lysis and lavage in patients with temporomandibular joint symptoms associated with generalized osteoarthritis or rheumatoid arthritis. *Journal of Oral Maxillofacial Surgery*, 56: 147-151.

Hamuryudan, V., (2007). Romatizmal hastalıklar. *Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Sempozyum Dizisi*, 55: 69-86.

Hanafy, S., El-Kadi, A. O. S. ve Jamali, F., (2012). Effect of inflammation on molecular targets and drug transporters. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 15(3):361-375.

Hancı, M., Karamese, M., Tosun, Z., Aktan, T.M., Duman, S. ve Savacı, N., (2015). Intra-articular platelet-rich plasma injection for the treatment of temporomandibular disorders and a comparison with arthrocentesis. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, 43: 162-166.

Herb, K., Cho, S. ve Stiles, M. A., (2006). Temporomandibular joint pain and dysfunction. *Current Pain and Headache Reports*, 10: 408–414

Hochberg, M. C., Chane, R. W., Dwosh, I., ve diğerleri, (1991). The ACR 1991 revised criteria for the classification of the global functional status in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatology*, 25:498-502.

Hofman, M. A., Skene, D. J. ve Swaab, D. F. (1995). Effect of photoperiod on the diurnal melatonin and 5-methoxytryptophol rhythms in the human pineal gland. *Brain Research*, 671(2): 254–260.

Holwegner, C., Reinhardt, A. L., Schmid, M. J., Marx, D. B. ve Reinhardt, R. A., (2015). Impact of local steroid or statin treatment of experimental temporomandibular joint arthritis on bone growth in young rats. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedy*, 147(1): 80-8.

Jimenez-Caliani, A. J., Jimenez-Jorge, S., Molinero, P., Guerrero, J. M., Fernandez-Santos, J. M., Martin-Lacave, I. ve diğerleri, (2005). Dual effect of melatonin as proinflammatory and antioxidant in collagen-induced arthritis in rats. *Journal of Pineal Research*, 38: 93–99.

Kanbe, K., Oh, K., Chiba, J., Inoue, Y., Taguchi, M. ve Yabuki, A., (2016). Analysis of Mitogen-Activated Protein Kinases in Bone and Cartilage of Patients with Rheumatoid Arthritis Treated with Abatacept. *Clinical Medicine Insights: Arthritis and Musculoskeletal Disorders*, 10(9):51-6.

Kaya, E. (2009). *Romatoid Artrit, Ankilozan Spondilit ve Sjögren Sendromlu Hastalarda Temporomandibular Eklemin Klinik Ve Radyolojik Olarak İncelenmesi*. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara.

Kent, J. N., Carlton, D. M. ve Zide, M. F., (1986). Rheumatoid disease and related arthropathies: Surgical rehabilitation of the temporomandibular joint. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology*, 61: 423-39.

Keystone, E. C., Schorlemmer, H. U., Pope, C. ve Allison, A. C., (1977). Zymosan-induced arthritis: a model of chronic proliferative arthritis following activation of the alternative pathway of complement. *Arthritis Rheumatology*, 20(7): 1396-1401.

Kim, S. J. ve Lee, S. R., (2014). Protective effect of melatonin against transient global cerebral ischemia-induced neuronal cell damage via inhibition of matrix metalloproteinase-9. *Life Sciences*, 94(1): 8-16.

Kınıklı, G.,(1995). *Spondilartropatiler. İç hastalıkları kitabı,kas-iskelet ve kollagen doku hastalıkları bölümü*,76-84. Ankara: Güneş Kitabevi.

Koh, P.O., (2008). Melatonin attenuates the cerebral ischemic injury via the MEK/ERK/p90RSK/bad signaling cascade. *Journal of Veterinary Medical Science*, 70(11): 1219-1223.

Kolaczowska, E., Grzybek, W., Rooijen, N., Piccard, H., Plytycz, B., Arnold, B. ve diğerleri, (2009). Neutrophil elastase activity compensates for a genetic lack of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in leukocyte infiltration in a model of experimental peritonitis. *Journal of Leukocyte Biology*, 85: 374–381.

Kuroda, S., Kuroda, Y., Tomita, Y. ve Tanaka, E., (2012). Long-term stability of conservative orthodontic treatment in a patient with rheumatoid arthritis and severe condylar resorption. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 141(3): 352–362.

Kwoh, C. K., Anderson, L. G., Greene, J. M., Johnson, D. A., O'Dell, J. R., Robbins, M. L., ve diğerleri, (2002). Guidelines for the management of rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 46(2): 328–346.

Laskin, D. M., (2001). *Temporomandibular joint pain in: kelley's textbook of rheumatology*. Sixth edition. 77: 557-567.

Lee, S. Y., Jung, Y. O., Ryu, J. G., Oh, H. J., Son, H. J., Lee, S. H., ve diğerleri (2016). Epigallocatechin-3-gallate ameliorates autoimmune arthritis by reciprocal regulation of T helper-17 regulatory T cells and inhibition of osteoclastogenesis by inhibiting STAT3 signaling. *Journal of Leukocyte Biology*, Epub ahead of print.

Lerner, A. B., Case, J. D., Takahashi, Y., Lee, T. H. ve Mori, W., (1958). Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *Journal of the American Chemical Society*, 80: 2587.

Lin, G. J., Huang, S. H., Chen, S. J., Wang, C. H., Chang, D. M. ve Sytwu, H. K., (2013). Modulation by melatonin of the pathogenesis of inflammatory autoimmune diseases. *International Journal of Molecular Science*, 14(6): 11742–11766.

Lin, Y.C., Hsu, M. L., Yang, J. S., Liang, T. H., Chou, S. L. ve Lin, H.Y., (2007). Temporomandibular joint disorders in patients with rheumatoid arthritis. *Journal of the Chinese Medical Association*, 70: 527-534.

Lin, C. H., Yu, M. C., Chiang, C. C., Bien, M. Y., Chien, M. H. ve Chen, B. C., (2013). Thrombin-induced NF- κ B activation and IL-8/CXCL8 release is mediated by c-Src-dependent Shc, Raf-1, and ERK pathways in lung epithelial cells. *Cellular Signaling*, 25(5):1166-1175.

Lissoni P, Pittalis S, Rovelli F ve diğerleri, (1996). Immunomodulatory properties of a pineal indole hormone other than melatonin, the 5-methoxytryptophol. *Journal of Biological Regulators & Homeostatic Agents*, 10(1): 27–30.

Lissoni, P., Messina, G. ve Rovelli, F., (2012). Cancer as the main aging factor for humans: the fundamental role of 5-methoxy-tryptamine in reversal of cancer-

induced aging processes in metabolic and immune reactions by non-melatonin pineal hormones. *Current Aging Science*, 5(3): 231-235.

Liu, X., Gong, Y., Xiong, K. Ye, Y., Xiong, Y., Zhuang, Z. ve diğerleri, (2013). Melatonin mediates protective effects on inflammatory response induced by interleukin-1 beta in human mesenchymal stem cells. *Journal of Pineal Research*, 55: 14-25.

Macovei, L. A. ve Rezuş, E., (2016). Cervical spine lesions in rheumatoid arthritis patients. *Revista Medico-Chirurgicala a Societatii de Medici si Naturalisti din Iasi*, 120(1):70-76.

Menendez-Pelaez, A., Poeggeler, B., Reiter, R. J., Barlow-Walden, L., Pablos, M. I. ve Tan D. X., (1993). Nuclear localization of melatonin in different mammalian tissues: Immunocytochemical and radioimmunoassay evidence. *Journal of Cellular Biochemistry*, 53: 373-382.

Mercuri, L. G. (2016). *Temporomandibular Joint Total Joint Replacement – TMJ TJR*. Chicago, USA: Springer.

Mercuri, L. G., Edibam, N. R. ve Giobbie-Hurder, A., (2007). Fourteen-year follow-up of a patient-fitted total temporomandibular joint reconstruction system. *Journal of Oral Maxillofacial Surgery*, 65: 1140-1148.

Millán-Plano, S., Piedrafita, E, Miana-Mena, F. J., Fuentes-Broto, L., Martínez-Ballarín, E., López-Pingarrón, L. ve diğerleri (2010). Melatonin and structurally-related compounds protect synaptosomal membranes from free radical damage. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(1): 312-328.

Miller, I. Erişim: 19.05.2016,
<https://www.studyblue.com/#flashcard/view/9499776>

Min, K. J., Jang, J. H. ve Kwon, T. K., (2012). Inhibitory effects of melatonin on the lipopolysaccharide-induced CC chemokine expression in BV2 murine microglial cells are mediated by suppression of Akt-induced NF-κB and STAT/GAS activity. *Journal of Pineal Research*, 52(3): 296-304.

Mobasheri, A., Henrotin, Y., Bielsalski, H. K. ve Shakibaei, M., (2012). Scientific evidence and rationale for the development of curcumin and resveratrol as nutraceuticals for joint health. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(4): 4202-4232.

Moen, K., Bertelsen, L. T., Hellem, S., Jonsson, R. ve Brun, J. G., (2005). Salivary gland and temporomandibular joint involvement in rheumatoid arthritis: relation to disease activity. *Oral Diseases*, 11: 27-34.

Negi, G., Kumar, A. ve Sharma, S.S., (2011). Melatonin modulates neuroinflammation and oxidative stress in experimental diabetic neuropathy: effects on NF- κ B and Nrf2 cascades. *Journal of Pineal Research*, 50(2):124-131.

Nielsen, R. H., Christiansen, C., Stolina, M. ve Karsdal, M. A., (2008). Oestrogen exhibits type II collagen protective effects and attenuates collagen-induced arthritis in rats. *Clinical and Experimental Immunology*, 152: 21-27.

Nucleus Medical Media (t.y.). Erişim: 23.05.2016.
<http://www.nucleuscatalog.com/temporomandibular-joint-tmj/view-item?ItemID=9324>.

Okatani, Y., Yamamoto, K., Hayashi, A., Wakatsuki Y. ve Sagara, Y. (1998). Maternal-fetal transfer of melatonin in human pregnancy near term. *Journal of Pineal Research*, 25: 129-134.

Okeson, J. P., (1993). *Management of temporomandibular disorder and occlusion*. 3rd ed. Missouri: Mosby Year Book.

Okeson, J. P., (2008). *Management of temporomandibular disorder and occlusion*. 6th ed. Missouri: Mosby Year Book.

Ouzir, M., Bouhaddou, N., Khalki, H. ve Lakhdar-Ghazal, N., (2013). Physiological and pharmacological properties of 5-methoxytryptophol. *Expert Review Endocrinology and Metabolism*, 8(4): 355-364.

Pakozdi, A., Amin, M. A., Haas, C. S., Martinez, R. J., Haines, G. K., Santos, L. L. ve diğerleri, (2006). Macrophage migration inhibitory factor: a mediator of matrix metalloproteinase-2 production in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research and Therapy*, 8(4): 132.

Pap, T., Nawrath, M., Heinrich, J., Bosse, M., Baier, A., Hummel, K. M. ve diğerleri, (2004). Cooperation of Ras- and c-Myc-dependent pathways in regulating the growth and invasiveness of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatology*, 50(9): 2794-2802.

Poswillo, D., (1970). Experimental investigation of the effects intra-articular hydrocortisone and high condylectomy on the mandibular condyle. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 30: 161.

Reiter, R. J., Calvo, J. R., Karbownik, M., Qi, W. ve Tan, D. X., (2000). Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Annals of the New York Academy Science*, 917: 376-386.

Reiter, R.J., (1991). Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocrine Reviews*, 12: 151-180.

Rivanor, R. L. C., Chaves, H. V., Val, D. R., Freitas, A. R., Lemos, J. C., Rodrigues, J. A. G ve diğerleri, (2014). A lectin from the green seaweed caulerpa cupressoides reduces mechanical hyper-nociception and inflammation in the rat temporomandibular joint during zymosan-induced arthritis. *International Immunopharmacology*, 21(1): 34-43.

Rocha, F. A. C., Aragao Jr, A. G. M., Oliveira, R. C., Pompeu, M. M. L., Vale, M. R. ve Ribeiro, R. A., (1999). Periarthritis promotes gait disturbance in zymosan-induced arthritis in rats. *Inflammation Research*, 48(9): 485-490.

Rodriguez-Naranjo, M. I., Moyá, M. L., Cantos-Villar, E. ve Garcia-Parrilla, M.C., (2012). Comparative evaluation of the antioxidant activity of melatonin and related indoles. *Journal of Food Composition and Analysis*, 28: 16-22.

Rogawski, M. A., Roth, R. H. ve Aghajanian, G. K., (1979). Melatonin: deacetylation to 5-methoxytryptamine by liver but not brain aryl acylamidase. *Journal of Neurochemistry*, 32(4): 1219–1226.

Rudra, D. S., Pal, U., Maiti, N. C., Reiter, R. J. ve Swarnakar, S., (2013). Melatonin inhibits matrix metalloproteinase-9 activity by binding to its active site. *Journal of Pineal Research*, 54: 398–405.

Saeed, N. R., McLeod, N. M. H. ve Hensher, R., (2001). Temporomandibular joint replacement in rheumatoid-induced disease. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 39: 71–75.

Satué, M., Ramis, J. M., Arriero, M. M. ve Monjo, M. (2015). A new role for 5-methoxytryptophol on bone cells function in vitro. *Journal of Cellular Biochemistry*, 116(4): 551-558.

Schiffman, E., Ohrbach, R., Truelove, E., Look, J., Anderson, G., Goulet, J. P. ve diğerleri, (2014). Diagnostic criteria for temporomandibular disorders (DC/TMD) for clinical and research applications: recommendations of the international RDC/TMD consortium network and orofacial pain special interest group. *Journal of Oral & Facial Pain Headache*, 28(1): 6–27.

Şehirli, A.Ö., Koyun, D., Tetik, Ş, Özsavcı, D., Yiğiner, Ö., Çetinel, Ş., ve diğerleri, (2013). Melatonin protects against ischemic heart failure in rats. *Journal of Pineal Research*, 55(2): 138-148.

Seki, H., Fukuda, M., Iino, M., Takahashi, T. ve Yoshioka, N., (2004). Immunohistochemical localization of cyclooxygenase-1 and -2 in synovial tissues from patients with internal derangement or osteoarthritis of the temporomandibular joint. *International Journal of Maxillofacial Surgery*, 33(7): 687-692.

Şener, G., Şehirli, A. O., Keyer-Uysal, M., Arbak, S., Ersoy, Y. ve Yeğen, B.C., (2002a). The protective effect of melatonin on renal ischemia-reperfusion injury in the rat. *Journal of Pineal Research*, 32: 120-126.

Şener, G., Şehirli, A.O., Satiroğlu, H., Keyer-Uysal, M. ve Yeğen, B. C., (2002b). Melatonin improves oxidative organ damage in a rat model of thermal injury. *Burns*, 28: 419-425.

Şener, G., Tosun, O., Şehirli, A. O., Kaçmaz, A., Arbak, S., Ersoy, Y. ve diğerleri, (2003). Melatonin and N-acetylcysteine have beneficial effects during hepatic ischemia and reperfusion. *Life Sciences*, 72: 2707-2718.

Seymour, R. L., Crouse, V. L. ve Irby, W.B., (1985). Temporomandibular ankylosis secondary to rheumatoid arthritis. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology*, 40: 584-589.

Sidebottom, A.J. ve Salha, R., (2013). Management of the temporomandibular joint in rheumatoid disorders. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 51: 191-198.

Singh, S. ve Varghese, D., (2013). Single puncture arthrocentesis of temporomandibular joint; introducing a novel device: A pilot study. *National Journal of Maxillofacial Surgery*, 4(2): 193-197.

Strand, V. ve Kavanaugh, A. F., (2004). The role of interleukin-1 in bone resorption in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 43:10-16.

Suzuki, T., Segami, N., Nishimura, M. ve Nojima, T., (2002). Co-expression of interleukin-1b and tumor necrosis factor a in synovial tissues and synovial fluids of temporomandibular joint with internal derangement: comparison with histological grading of synovial inflammation. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 31; 549-557.

Tchaparian, E., Marshal, L., Cutler, G., Bauerly, K., Chowanadisai, W., Satre, M., ve diğerleri (2010). Identification of transcriptional networks responding to pyrroloquinoline quinone dietary supplementation and their influence on thioredoxin expression, and the JAK/STAT and MAPK pathways. *Biochemical Journal*, 429: 515-526.

Traveller, L., (01.06.2012). *Human Anatomy*. <http://msk-anatomy.blogspot.com.cy/2012/06/temporomandibular-joint-anatomyt-m.html>

Triegeer, N., Hoffman, C.H. ve Rodriguez, E., (1999). Effect of arthrocentesis of the temporomandibular joint in patients with rheumatoid arthritis. *Journal of Oral Maxillofacial Surgery*, 57: 537-540.

Türker, M. ve Yücetaş, Ş., (1997). *Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Kitabı* (S: 585-595). Ankara: Atlas Kitapçılık.

Tüzüm, M. Ş. ve Harorlı, A., (1987). *Erzurum'da temporomandibuler eklem hastalıklarının insidansı*. GATA Diş Hekimliği Bilgileri Merkezi 1. Bilimsel Kongre Oral Sunumu, Ankara.

Veldhuis, E. C., Veldhuis, A. H. ve Koudstaal, M. J., (2014). Treatment management of children with juvenile idiopathic arthritis with temporomandibular joint involvement: a systematic review. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology*, 117:581-589.

Vos, L. M., Slater, J. J. R. H ve Stegenga, B., (2014). Arthrocentesis as initial treatment for temporomandibular joint arthropathy: A randomized controlled trial. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, 42: 134-139.

Wahl, S. M., McCartney-Francis, N., Chan, J., Dionne, R., Ta, L. ve Orenstein, J. M., (2003). Nitric oxide in experimental joint inflammation. *Cells Tissues Organs*, 174: 26-33.

Wang, X. D., Zhang, J. N., Gan, Y. H. ve Zhou, Y. H., (2015). Current understanding of pathogenesis and treatment of tmj osteoarthritis. *Journal of Dental Research*, 94(5): 666- 673.

Westermarck, J., Li, S. P., Kallunki, T., Han, J. ve Kähäri, V.M., (2001). p38 mitogen-activated protein kinase-dependent activation of protein phosphatases 1 and 2A inhibits MEK1 and MEK2 activity and collagenase 1 (MMP-1) gene expression. *Molecular Cell Biology*, 21(7): 2373-2383.

Wu, K. K., Cheng, H. ve Chang, T., (2014). 5-methoxyindole metabolites of L-tryptophan: control of COX-2 expression, inflammation and tumorigenesis. *Journal of Biomedical Science*, 21:17.

Xue, M., March, L., Sambrook, P. N. ve Jackson, C. J., (2007). Differential regulation of matrix metalloproteinase 2 and matrix metalloproteinase 9 by activated protein C: relevance to inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatology*, 56: 2864–2874.

Yalçın, S. ve Aktaş, İ., (2010). *Diş Hekimliğinde Temporomandibular Eklem Hastalarına Yaklaşım*. İstanbul: Vestiyer Yayın Grubu.

Yang, S., Jiang, S., Wang, Y., Tu, S., Wang, Z. ve Chen, Z., (2016). Interleukin 34 upregulation contributes to the increment of microRNA 21 expression through STAT3 activation associated with disease activity in rheumatoid arthritis. *Journal of Rheumatology*, Epub ahead of print.

Yeung, K. C., Rose, D. W., Dhillon, A. S., Yaros, D., Gustafsson, M., Chatterjee, D. ve diğerleri, (2001). Raf kinase inhibitor protein interacts with NF-kappa B-inducing kinase and TAK1 and inhibits NF-kappa B activation. *Molecular Cell Biology*, 21(21): 7207-7217.

Yıldırım, D., (2008). *Romatoid Artritinin Temporomandibular Eklem ve Çiğneme Kasları Üzerindeki Etkilerinin Klinik, Radyolojik ve Manyetik Rezonans Görüntüleme Teknikleri ile Değerlendirilmesi*. Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta.

Zundler, S. ve Neurath M. F., (2016). Integrating immunologic signaling networks: the JAK/STAT pathway in colitis and colitis-associated cancer. *Vaccines (Basel)*. 4(1): 5.

T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (İMÜ-HADYEK)

Sayı : 38328770 -46
Konu: Etik Kurulu Kararı

11/05/2015

Sayın Prof. Dr. M. Şenol TÜZÜM

Üniversitemizin Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna yapmış olduğunuz “Sıçanlarda Zymosan ile oluşturulan Temporomandibuler eklem artriti modelinde melatonin ve 5-methoxytryptofol' un etkilerinin araştırılması” isimli başvurunuz incelenmiş olup, etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim .


Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(İMÜ-HADYEK) Başkanı

EK:

-Karar Formu (1 sayfa)

Tel: (0216)681 51 37
Faks: (0212)531 75 55
E-mail: ilknurfil@medipol.edu.tr

Adres: Kavacık Mah. Ekinciler Cad. No: 19, 34810
Kavacık/BEYKOZ



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ,
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (İMÜ-HADYEK)
ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
11/05/2015	36		Prof. Dr. M. Şenol TÜZÜM

“Sıçanlarda Zymosan ile oluşturulan Temporomandibuler eklem artrit modelinde melatonin ve 5-methoxytryptofol' un etkilerinin araştırılması” başlıklı bilimsel araştırma Etik Kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna “oybirliği” ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 1 yıl

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK	
Başkan Yardımcısı	Prof. Dr. Dr. Ertuğrul KILIÇ	
Üye	Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK	
Üye	Yrd. Doç. Dr. H. Emir YÜZBAŞIOĞLU	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Sine Özmen TOĞAY	
Üye	Taha KELEŞTEMUR	
Üye	Ekrem Musa ÖZDEMİR	
Üye	Özge Şeyda DURGUT	
Üye	Fahriye ŞENBAHÇE	

Original Article

Effects of melatonin and 5-methoxytryptophol on synovial inflammation in the zymosan-induced rheumatoid arthritis in rats

Gokce Savtekin¹, Mustafa Senol Tuzum¹, Lokman Onur Uyanik¹, Aysa Ayali¹, Ayliz Velioglu Ögünç², Şule Çetinel³, Ertuğrul Kılıç⁴, Ahmet Özer Şehirli^{5,6}

¹Near East University, Faculty of Dentistry, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Mersin 10, Turkey;

²Marmara University, Vocational School of Health Related Professions, Turkey; ³Marmara University, School of Medicine, Department of Histology & Embryology, Turkey; ⁴Medipol University, School of Medicine, Department of Physiology, Turkey; ⁵Marmara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacology, Turkey; ⁶Near East University, Faculty of Dentistry, Turkey

Received December 30, 2015; Accepted March 24, 2016; Epub April 15, 2016; Published April 30, 2016

Abstract: The aim of this study is the investigation of synoviocytes, cytokines and metalloproteinases in the synovial inflammation model which is created by zymosan application to temporomandibular joint (TMJ) and effects of pineal hormones melatonin (MEL) and 5-methoxytryptophol (5-MTX) on these parameters. 200-250 g Wistar albino rats of both sexes were used for modeling arthritis in this study. Arthritis model was created by intraarticularly (i.a.) injecting 2 mg zymosan in 40 ml saline into the left temporomandibular joint of the rats while the sham group was created by only injecting 40 ml saline solution (intraarticular). MEL and 5-MTX administration was made intraperitoneal before zymosan injection. 6 hours after zymosan or saline administration of MEL and 5-MTX the synovial fluid was collected from the animals and the synovial membrane was collected for histological assessment. The administration of zymosan increased the release of IL-1 β and TNF α and the activity of metalloproteinases (MMP-9) and metalloproteinases-2 (MMP-2) and with this administration values got closer to the sham group. The histological evaluation showed significant increase in the intensity of synoviocytes that arose in the inflammation was found to subside. In conclusion, MEL and 5-MTX reducing inflammation in arthritis suggests these agents might constitute a new therapeutic principle clinically.

Keywords: Zymosan, synovial membrane, melatonin, 5-methoxytryptophol

Introduction

Temporomandibular joint (TMJ) disorder is a condition that results in a high degree of pain in speech, eating and other daily activities [1]. The most common of these disorders which is rheumatoid arthritis (RA) is musculo-skeletal discomfort which affects a large portion of the population and can be seen at any age [2, 3].

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory autoimmune disease and the condition is characterized by particularly inflammatory cell infiltration of the synovial membrane [4]. Excessive release of inflammatory mediators that are produced by inflammatory cells, contributes to joint destruction. Mediators such as tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and interleukin1-beta (IL-1 β) are associated with the pa-

thogenesis of arthritis and causes an increase in the secretion of proteolytic enzymes such as matrix synovial metalloproteinase-2 (MMP-2) and metalloproteinase-9 (MMP-9) in stromal cells [5, 6]. These enzymes degrade specific peptide bonds of the extracellular matrix proteins and help expression of inflammatory cells. Zymosan which we used in our study to create the arthritis is a polysaccharide that is capable of severe and erosive synovitis that can be produced from yeast cell walls. The intraarticular injection of this agent has been shown to cause inflammation by enhancing the activation of cytokines such as TNF- α and IL-1 β and proteolytic enzymes [7].

Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) (MEL), the disintegration product of serotonin,

Protective effect of Melatonin and 5-Methoxytryptophol against synovial inflammation

mainly released from the pineal gland especially in the dark, plays a role in many physiological processes such as circadian rhythm, immune function and sexual behavior [8]. In earlier studies antioxidant and anti-inflammatory effects of these agents has been shown [9, 10]. It creates anti-inflammatory effect by inhibiting the adhesion molecules stimulated by NF- κ B, reducing the migration of leukocytes from endothelial cells and thus preventing the PMN leukocytes from aggregating in the inflamed area [11, 12]. Consequently, it is stated that MEL is reported to inhibit tissue damage by inhibiting the generation of proteolytic enzymes and cytokines that are caused by the release of both direct and indirect free radicals during inflammatory events [13].

5-Methoxytryptophol (5-MTX), another pineal indole created by the decomposition of serotonin, plays a role in the regulation of many biological activities such as pro or anti-gonadotropic effects of biological rhythms and their reproductive behavior [14]. Features demonstrate an adverse effect on the light dark cycle with MEL. Since the secretion of MEL is high in the dark, while 5 MTX is secreted in light [15]. Despite a lack of studies with 5-MTX, antioxidant and immunomodulatory effects were observed [16, 17]. Studies in recent years focused on the evaluation of superiority or differences of the effects of MEL and 5-MTX [18, 19]. The recent study, assess the effects of these two pineal indoles on bone marrow formation revealed 5-MTX has more protective effects with its antioxidant and anti-inflammatory effects compared with MEL [20].

In this study we aimed to compare the effects of MEL and 5-MTX and to examine whether there is a synergistic effect of the combined used of MEL and 5-MTX on synovial inflammation model that created with zymosan application.

Materials and methods

200-250 g Wistar albino rats of both sexes were used. Animals were acclimated in the laboratory conditions two weeks prior to the experiment ($20^{\circ}\text{C} \pm 2$, 12 h light/12 hours dark). [This study has been done with the approval of Medipol University Animal Ethics Committee (Ref No. 38328770-46)].

Groups and experimental protocol

Our study comprised of 5 groups with 8 rats per group. The synovial inflammation rat model was set up as previously described [1].

Sham group: The rats in this group were administered saline intraarticularly (i.a.) to the TMJ under ketamine anesthesia (100 mg/kg, 40 ml).

Synovial inflammation (SI) group: 2 mg zymosan 40 ml was dissolved in saline and administered intraarticularly (i.a.) into the TMJ.

SI + melatonin group: 10 mg/kg intraperitoneally MEL injection 15 minutes before zymosan administration.

SI + 5-methoxytryptophol group: 30 minutes before injection of zymosan (i.a.), 5 mg/kg 5-methoxytryptophol intraperitoneally (i.p.) was injected.

SI + 5-methoxytryptophol + melatonin group: 5 mg/kg 5-MTX intraperitoneally 30 minutes before zymosan and 10 mg/kg melatonin intraperitoneally (i.p.) 15 minutes before zymosan were injected.

Synovial Fluid Collection, done on anesthetized rats by zymosan injection (i.a). 0.05 ml of EDTA in neutral buffered PBS used to wash TMJ cavity. Washing done twice with pumping and aspirating technique and then synovial fluid was collected and the rats were decapitated under anesthesia after 6 hours [1]. In synovial fluid, tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukin 1-beta (IL-1 β) levels and matrix metalloproteinase (MMP-2 and MMP-9) activities were measured [21].

Histological studies

Light microscopy: Synovial membrane was excised after sacrificing animals. Then specimens were fixed in 10% neutral buffered formalin for 24 h, followed by demineralization in 10% EDTA, embedded in paraffin, and 5-6 μm sectioned along the synovial membrane. Synovial membrane sections were evaluated under light microscopy at 400 $\times$. For the specimens processed for routine hematoxylin-eosin (H&E) staining, histological analysis considered to the synoviocytes influx in the synovial membrane [1].

Protective effect of Melatonin and 5-Methoxytryptophol against synovial inflammation

Table 1. Tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) values of all groups of synovial fluid in synovial inflammation (SI) model on rats created by zymosan

	SHAM	SI	SI-MEL	SI-5-MTX	SI-MEL + 5-MTX
TNF- α (pg/ml)	152 $\pm$ 11	254 $\pm$ 17***	179 $\pm$ 15*	171 $\pm$ 11**	150 $\pm$ 11**
IL-1 β (pg/ml)	51.8 $\pm$ 9.9	136.8 $\pm$ 14.8***	68.2 $\pm$ 9.1**	70.3 $\pm$ 11.5**	55.6 $\pm$ 9.6***

***P<0.001 comparisons according to the control group, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 comparisons according to SI group.

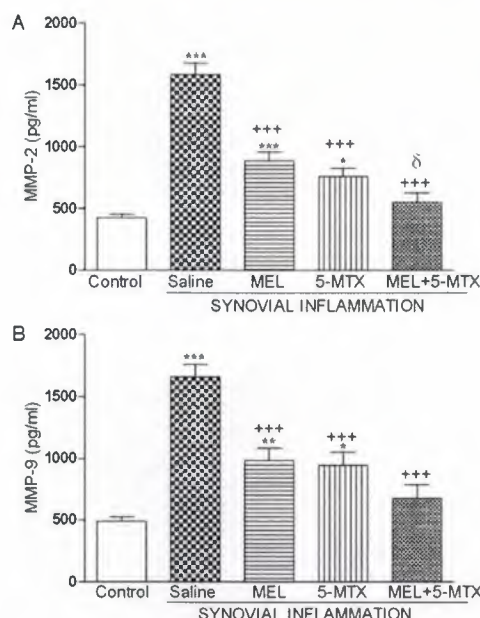


Figure 1. Activities of matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-9) belonging to the synovial fluids of all groups in the (SI) model which was created by synovial inflammation with zymosan administration on rats. MEL: Melatonin, 5-MTX: 5-methoxytryptophol. **P<0.01, ***P<0.001 according to the control group; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 comparisons according to SI group; P<0.05 comparisons according to MEL group.

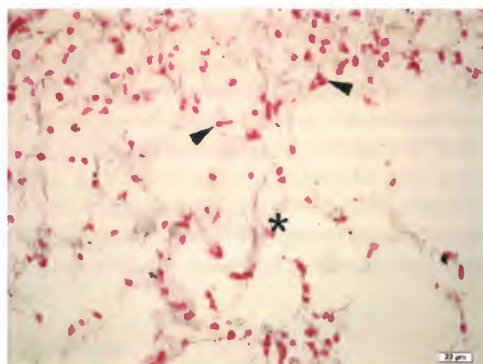


Figure 2. Sham group: The synoviocytes (arrowheads) observed with the spread morphology in the synovial membrane, synovia (*). Image magnification X400.

Examinations of Synovial Fluid

TNF- α , IL-1 β , MMP-2, MMP-9 analyses: In synovial fluid the analysis and measurements of TNF- α (ELISA, BioSource Europe S.A. Catalog No. KRC 3014 Nivelles, Belgium) IL-1 β (ELISA BioSource Catalog No. KRC0011, Nivelles, Belgium) MMP-2 (ELISA, Catalog No. Abnova KAO393, Taoyuan, Taiwan), MMP-9 (ELISA, Catalog No. Abnova KAO398, Taoyuan, Taiwan) were done considering appropriate criteria according to the instructions.

Statistical methods

One-way analysis of variance (ANOVA) based on statistical evaluation and as advanced analysis Tukey's test was performed. Where *P* values were less than 0.05, were considered significant.

Results

In SI group, TNF- α , IL-1 β levels belonging to the synovial fluid were significantly higher than the control group (Table 1). In contrast to SI group increase in TNF- α , IL-1 β levels in melatonin (MEL), 5-methoxytryptophol (5-MTX) and MEL+5-MTX administrated groups was significantly lower. In only MEL and only 5-MTX administered groups, TNF- α and IL-1 β levels remained higher than the control group.

Upon the assessment of the synovial fluid's MMP-2 and MMP-9 activities, SI administered group was found to be significantly higher compared to the control group. In contrast, melatonin (MEL), 5-methoxytryptophol (5-MTX) administered groups has significantly dropped and was closer to control group values. Between the combined application and single applications, only MEL administered group showed significant reduction in their MMP-2 levels and other parameters did not show any variance (Figure 1).

The histological examination of the tissue made synovial tissue synoviocytes in sham group,

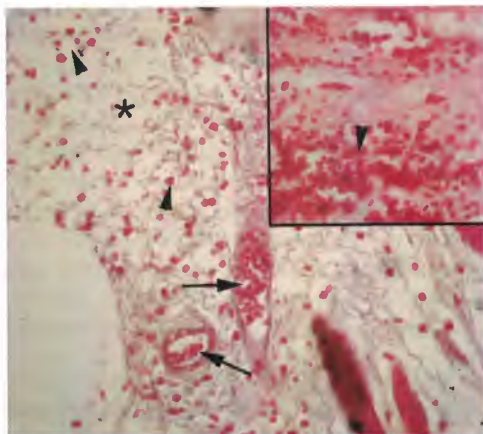


Figure 3. Saline administered synovial inflammation (SI) group: Intense congestion of the capillaries (arrows) and synoviocytes (arrowheads), intense synovia (*). Image magnification X400.

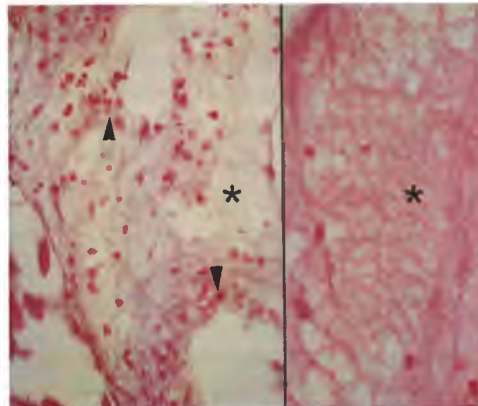


Figure 5. SI + melatonin (MEL) group: Capillary congestion and fairly significant regression in synoviocytes intensity (arrowheads), synovial cell density (*). Image magnification X400.

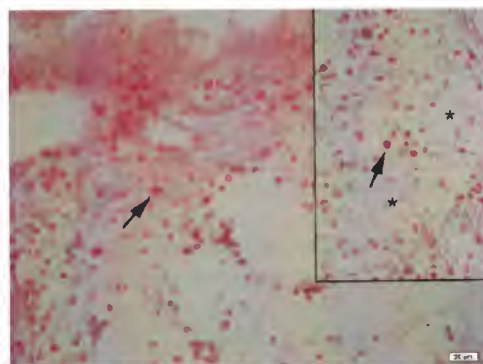


Figure 4. SI + 5-methoxytryptophol (5-MTX) group: Capillary congestion and synoviocytes intensity (arrowheads) moderate regression. Image magnification X400.

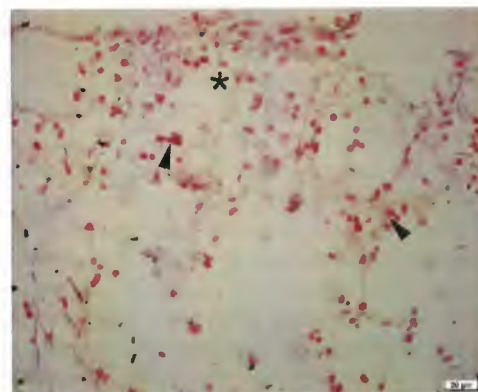


Figure 6. SI + 5-MTX + MEL: Synovium (*) significantly reduced synoviocytes intensity (arrowheads). Image magnification X400.

exhibits a smooth appearance (**Figure 2**) while SI group synoviocytes showed damage characterized by an increase in synoviocytes density and capillary congestion (**Figure 3**). SI + 5-MTX group showed the congestion decreased while cell density remain decreased (**Figure 4**). In SI + MEL group decreased congestion and a significant decrease in cell density was observed (**Figure 5**). SI + MEL + MTX group showed apparent reduction in density of synoviocytes (**Figure 6**).

Discussion

Inflammation associated with arthritis is a serious health problem that affects many people

worldwide. In particular, it does not have a perfect cure despite many studies done on the subject and many applications administered in the treatment of synovial inflammation due to temporomandibular joint diseases [22].

Different mechanisms are suggested to explain temporomandibular joint disorders characterized by pain, tenderness and limitation of the jaw movement. Many mediators such as proteolytic enzymes, synoviocytes, monocytes/macrophages, platelets, complement and coagulation systems, cytokines are thought to be involved in the formation of injury [23]. These mediators are collected mainly in the synovial area and cause structural damage on the membrane.

In our study, zymosan which is a polysaccharide synthesized from yeast cell walls has been shown to promote the formation of the synovitis by causing an increase in cell migration in the vascular permeability with mononuclear cell infiltration [24-26]. Especially in zymosan inflammation models 0.25, 0.5, 1 or 2 mg doses tried and the effects in different times were evaluated [1]. Both literature findings and our preliminary study shows the 2 mg intervals zymosan injection causes intense inflammation after 6 hours.

Cytokines, secreted by immune cells, play a major role in hematopoiesis, cell division and differentiation control, tissue repair, and inflammation. Synovial inflammation leads to release of the pro-inflammatory mediators such as TNF- α , IL-1 β from synovial cells and an increase of the biosynthesis of adhesion molecules that mediate leukocyte-endothelial cell adhesion [27]. In a recent study, it is stated that synovocytes infiltration in the synovial fluid TNF- α and IL-1 β levels are increased [28]. A clinic study of 31 arthritis patients suggests increased cytokines, TNF- α and IL-1 β over inflammation by activating the collagen synthesis in fibroblast type 1 by activating metalloproteases [29]. In accordance with these literatures our study showed in zymosan caused inflammation also there was an increase in cytokines, TNF- α and IL-1 β in synovial fluid. As is known, increase in pro-inflammatory cytokines indicate an inflammatory response by the organism in which inflammation is important starting causing tissue damage [30]. The positive effects of therapeutic agents on tissue parameters of our study given the levels of cytokines in synovial fluid of these agents in the synovial inflammation is significantly suppressed by supporting the important role of these cytokines. Therefore, the agents used in synovial inflammation treatment having inhibitory properties on cytokines expression will increase the success of treatment. The present study showed that MEL prevents the inflammation caused by IL-1 β on mesenchymal stem cells and contributes to bone regeneration [23]. In the arthritis model in which the antioxidant and anti-inflammatory effect of MEL is studied has shown that these agents decrease levels of TNF- α and IL-1 β [12].

The study has shown that antioxidant effects of 5-MTX which is another pineal indole, IL-6 is

reduced which is a pro-inflammatory cytokines and increased IL-2 levels in the serum which is an inflammatory cytokines with an immunomodulator effect despite the studies about inflammations show a lack [31]. However, there aren't enough studies in the literature on the effects of 5-MTX on TNF- α and IL-1 β . When all these studies are considered our findings conform to the literature, showing that MEL and 5-MTX's inhibitory effects on pro-inflammatory cytokines helps the tissue protective effects.

Matrix metalloproteinases (MMPs) are a family of zinc-dependent metalloendopeptidases, consists of 5 subgroups namely; collagenase, stromelysin, gelatinase, membrane-type, and others and be expressed in epithelial, mesenchymal, and haematopoietic cells [32]. In experimental and clinical studies, inflammation and gelatinase subfamily consists of connective tissue diseases in MMP-2 (gelatinase A) and MMP-9 (gelatinase B) shows the important role played [33]. The present study showed the increased activation of this proteolytic enzyme in experimental inflammation both created with zymosan and macrophage migration inhibitory factor to investigate the activity of MMP-2 [34]. On the other hand, the study suggest that the expression of MMP-9 increased in synovocytes, macrophages and master cells in the experimental peritonitis model created with zymosan [35]. Therefore, these MMPs show activity by destroying the extracellular matrix proteins by breaking down specific peptide bonds in various cell and tissues and play a role in pathological conditions such as rheumatoid arthritis, tumor invasion, apoptosis and angiogenesis [36]. Our results from the study are consistent with the literature. Zymosan application resulted in synovial fluid MMP-2 and MMP-9 activation increasing significantly compared with the control group and with MEL and 5-MTX administration improved significantly. MEL's effects on expressions of MMP-2 and MMP-9 has been studied in, several models of inflammation such as spinal cord injury [37], colitis [38], cerebral ischemia [39]. Antioxidant and anti-inflammatory properties of MEL in these models was shown that the protective effect is created by reducing the expression of MMP-9 and MMP-2. However, effects of both MEL and 5-MTX's on MMP-2 and MMP-9 activation has not been studied in any arthritis model. But so far effects of 5-MTX on proteolytic

Protective effect of Melatonin and 5-Metoxytryptophol against synovial inflammation

enzymes has not been studied before, it is a first with our research.

In conclusion: In our experimental study, pro-inflammatory cytokines and proteolytic enzymes increased and also that change observed in biochemical parameters accompanied by increase in synoviocytes and so the advent of tissue damage was observed. Pineal hormones melatonin and 5-methoxytryptophol, which we used for treatment has shown to significantly reduce this damage. To our knowledge this is the first study investigating the anti-inflammation effects of two pineal hormones in synovial inflammation and these two pineal hormones are normally responsible for the regulation of the circadian rhythm, effects are considered; 5-MTX that is released in brightness and MEL that is released in darkness. On the other hand this study being the first to research the effects of 5-MTX on cytokines levels and proteolytic enzymes is of importance in terms of contributing to the literature. Despite the fact more extensive and comparative clinical and experimental studies are needed for these agents to be used in the clinics our results suggest that MEL and 5-MTX's plays an important role on synovial inflammation repair thus we believe that further studies will shed light on later.

Acknowledgements

This research supported by the Near East University Centre of Excellence Research Foundation (www.neu.edu.tr) with the project number CE021-2015.

Disclosure of conflict of interest

None.

Address correspondence to: Dr. Gokce Savtekin, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Faculty of Dentistry, Near East University, Nicosia-Cyprus, Mersin 10, Turkey. Tel: 00 90 533 8494997; Fax: 00 90 392 6802050; E-mail: gokce_ces@hotmail.com

References

- [1] Chaves HV, Ribeiro Rde A, de Souza AM, Rodrigues e Silva AA, Gomes AS, Vale ML, Bezerra MM, Brito GA. Experimental Model of Zymosan-Induced Arthritis in the Rat Temporomandibular Joint: Role of Nitric Oxide and Neutrophils. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. J Biomed Biotechnol 2011; 2011: 707985.
- [2] Carlos FP, de Paula Alves da Silva M, de Lemos Vasconcelos Silva Melo E, Costa MS, Zamuner SR. Protective effect of low-level laser therapy (LLL) on acute zymosan-induced arthritis. *Lasers Med Sci* 2014; 29: 757-763.
- [3] Nonose N, Pereira JA, Machado PR, Rodrigues MR, Sato DT, Martinez CA. Oral administration of curcumin (*Curcuma longa*) can attenuate the neutrophil inflammatory response in zymosan-induced arthritis in rats. *Acta Cir Bras* 2014; 29: 727-34.
- [4] Ji J, Dou H, Li X, Song Y, Li X, Li E, Tan R and Hou Y. Novel benzenediamine derivative FC99 ameliorates zymosan-induced arthritis by inhibiting ROR γ t expression and Th17 cell differentiation. *Acta Biochim Biophys Sin* 2014; 46: 829-836.
- [5] Ed H. Rheumatoid arthritis: pathophysiology and implications for therapy. *N Engl J Med* 1990; 322: 1277-1289.
- [6] Nielsen RH, Christiansen C, Stolina M, Karsdal MA. Oestrogen exhibits type II collagen protective effects and attenuates collagen-induced arthritis in rats. *Clin Exp Immun* 2008; 152: 21-27.
- [7] da Conceição Rivanor RL, Chaves HV, do Val DR, de Freitas AR, Lemos JC, Rodrigues JA, Pereira KM, de Araújo IW, Bezerra MM, Benevides NM. A lectin from the green seaweed *Caulerpa cupressoides* reduces mechanical hyper-nociception and inflammation in the rat temporomandibular joint during zymosan-induced arthritis. *Int Immunopharmacol* 2014; 21: 34-43.
- [8] Rudra DS, Pal U, Maiti NC, Reiter RJ and Swarnakar S. Melatonin inhibits matrix metalloproteinase-9 activity by binding to its active site. *J Pineal Res* 2013; 54: 398-405.
- [9] Şehirli AÖ, Koyun D, Tetik Ş, Özavcı D, Yiğiner Ö, Çetinel Ş, Tok OE, Kaya Z, Akkiprik M, Kılıç E, Şener G. Melatonin protects against ischemic heart failure in rats. *J Pineal Res* 2013; 55: 138-48.
- [10] Borges Lda S, Dermargos A, da Silva Junior EP, Weimann E, Lambertucci RH and Hatanaka E. Melatonin decreases muscular oxidative stress and inflammation induced by strenuous exercise and stimulates growth factor synthesis. *J Pineal Res* 2015; 58: 166-72.
- [11] Reiter RJ, Calvo JR, Karbownik M, Qi W and Tan DX. Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 917: 376-86.
- [12] Forrest CM, Mackay GM, Stoy N, Stone TW and Darlington LG. Inflammatory status and kynurenine metabolism in rheumatoid arthritis treated with melatonin. *Br J Clin Pharmacol* 2007; 64: 517-526.

- [13] Cuzzocrea S and Reiter RJ. Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. *Eur J Pharmacol* 2001; 426: 1-10.
- [14] Ouzir M, Bouhaddou N, Khalki H and Lakhdar-Ghazal N. Physiological and pharmacological properties of 5-methoxytryptophol. *Expert Rev Endocrinol Metab* 2013; 8: 355-364.
- [15] Lewczuk B, Ziolkowska N, Prusik M and Przybylska-Gornowicz B. Diurnal profiles of melatonin synthesis-related indoles, catecholamines and their metabolites in the duck pineal organ. *Int J Mol Sci* 2014; 15: 12604-12630.
- [16] Lissoni P, Pittalis S, Rovelli F, Zecchini S, Casati M, Tremolada M and Pelizzoni F. Immunomodulatory properties of a pineal indole hormone other than melatonin, the 5-methoxytryptophol. *J Biol Regul Homeost Agents* 1996; 10: 27-30.
- [17] Rodriguez-Naranjo MI, Moyá ML, Cantos-Villar E and Garcia-Parrilla MC. Comparative evaluation of the antioxidant activity of melatonin and related indoles. *J Food Comp Anal* 2012; 28: 16-22.
- [18] Wang H and Ng TB. Hypotensive activity of the pineal indoleamine hormones melatonin, 5-methoxytryptophol and 5-methoxytryptamine. *Pharmacol Toxicol* 2000; 86: 125-8.
- [19] Ng TB, Liu F and Zhao L. Antioxidative and free scavenging activities of pineal indoles. *J Neural Transm* 2000; 107: 1243-1251.
- [20] Satué M, Ramis JM, Arriero MM and Monjo M. A new role for 5-methoxytryptophol on bone cells function in vitro. *J Cell Biochem* 2015; 116: 551-8.
- [21] Holwegner C, Reinhardt AL, Schmid MJ, Marx DB and Reinhardt RA. Impact of local steroid or statin treatment of experimental temporomandibular joint arthritis on bone growth in young rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2015; 147: 80-8.
- [22] Wang XD, Zhang JN, Gan YH and Zhou YH. Current understanding of pathogenesis and treatment of tmj osteoarthritis. *J Dent Res* 2015; 94: 666-73.
- [23] Liu X, Gong Y, Xiong K, Ye Y, Xiong Y, Zhuang Z, Luo Y, Jiang Q and He F. Melatonin mediates protective effects on inflammatory response induced by interleukin-1 beta in human mesenchymal stem cells. *J Pineal Res* 2013; 55: 14-25.
- [24] Keystone EC, Schorlemmer HU, Pope C and Allison AC. Zymosan-induced arthritis: a model of chronic proliferative arthritis following activation of the alternative pathway of complement. *Arthritis Rheum* 1977; 20: 1396-1401.
- [25] Gegout P, Gillet P, Chevrier D, Guingamp C, Terlain B and Netter P. Characterization of zymosan-induced arthritis in the rat: effects on joint inflammation and cartilage metabolism. *Life Sci* 1994; 55: 321-6.
- [26] Rocha FA, Aragão AG Jr, Oliveira RC, Pompeu MM, Vale MR, Ribeiro RA. Periarthritis promotes gait disturbance in zymosan-induced arthritis in rats. *Inflamm Res* 1999; 48: 485-90.
- [27] Wahl SM, McCartney-Francis N, Chan J, Dionne R, Ta L and Orenstein JM. Nitric oxide in experimental joint inflammation. *Cells Tissues Organs* 2003; 174: 26-33.
- [28] Belenska-Todorova L, Gyurkovska V and Ivanovska N. How complement activation influences the development of chronic synovitis in a mouse model of rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2015; 1-10.
- [29] Suzuki T, Segami N, Nishimura M and Nojima T. Co-expression of interleukin-1 β and tumor necrosis factor α in synovial tissues and synovial fluids of temporomandibular joint with internal derangement: comparison with histological grading of synovial inflammation. *J Oral Pathol Med* 2002; 549-57.
- [30] Güven O, Tekin U, Salmanoğlu B and Kaymak E. Tumor necrosis factor- α levels in the synovial fluid of patients with temporomandibular joint internal derangement. *J Craniomaxillofac Surg* 2015; 43: 102-5.
- [31] Lissoni P, Messina G and Rovelli F. Cancer as the main aging factor for humans: the fundamental role of 5-methoxy-tryptamine in reversal of cancer-induced aging processes in metabolic and immune reactions by non-melatonin pineal hormones. *Curr Aging Sci* 2012; 5: 231-5.
- [32] Xue M, March L, Sambrook PN and Jackson CJ. Differential regulation of matrix metalloproteinase 2 and matrix metalloproteinase 9 by activated protein C: relevance to inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 2864-2874.
- [33] Clegg PD, Burket RM, Coughlans AR, Riggs CM and Carter SD. Characterisation of equine matrix metalloproteinase 2 and 9; and identification of the cellular sources of these enzymes in joints. *Equine Vet J* 1997; 29: 335-342.
- [34] Pakozdi A, Amin MA, Haas CS, Martinez RJ, Haines GK, Santos LL, Morand EF, David JR and Koch AE. Macrophage migration inhibitory factor: a mediator of matrix metalloproteinase-2 production in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2006; 8: R132.
- [35] Kolaczowska E, Grzybek W, Rooijen N, Piccard H, Plytycz B, Arnold B and Opdenakker G. Neutrophil elastase activity compensates for a genetic lack of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in leukocyte infiltration in a model of experimental peritonitis. *J Leukoc Biol* 2009; 85: 374-381.

Protective effect of Melatonin and 5-Metoxytryptophol against synovial inflammation

- [36] Cunnane G, FitzGerald O, Hummel KM, Youssef PP, Gay RE, Gay S and Bresnihan B. Synovial tissue protease gene expression and joint erosions in early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 1744-1753.
- [37] Esposito E, Genovese T, Caminiti R, Bramanti P, Meli R and Cuzzocrea S. Melatonin regulates matrix metalloproteinases after traumatic experimental spinal cord injury. *J Pineal Res* 2008; 45: 149-156.
- [38] Esposito E, Mazzon E, Riccardi L, Caminiti R, Meli R and Cuzzocrea S. Matrix metalloproteinase-9 and metalloproteinase-2 activity and expression is reduced by melatonin during experimental colitis. *J Pineal Res* 2008; 45: 166-173.
- [39] Kim SJ and Lee SR. Protective effect of melatonin against transient global cerebral ischemia-induced neuronal cell damage via inhibition of matrix metalloproteinase-9. *Life Sci* 2014; 94: 8-16.