



ARAŞTIRMA / RESEARCH

Nitrik Oksit Sintaz İzofomlarının Deneysel Diş Hareketi Üzerine Etkileri

Effects of Nitric Oxide Synthase Isoforms During Experimental Tooth Movement

ÖZET

Amaç: Kemik yeniden şekillenmesinde birçok sistemik/lokal faktör rol oynamaktadır. Osteoblastlar tarafından üretilen hücreler arası sinyal düzenleyici olan Nitrik Oksit (NO), önemli bir kemik şekillenmesi düzenleyici olarak görevlidir. Bu çalışmanın amacı, farklı NO-izofomlarının ortodontik diş hareketi sırasında kemiğin yeniden şekillenmesi üzerine olan etkilerinin incelenmesidir. **Gereçler ve Yöntem:** Üç farklı NO-sintaz (NOS) inhibitörünün etkilerinin incelenmesi için 66 Sprague-Dawley rat rastgele 11 gruba ayrılmıştır. NOS inhibitörleri (iNOS-inhibitör 1400W-dihydrochloride, eNOS-inhibitör L-NIO-dihydrochloride ve nNOS-inhibitör Nω-propyl-L-arginine) üç farklı dozda uygulanmıştır (10, 30 ve 100µg/20µl); geriye kalan iki grup kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Bütün gruplarda, mandibular birinci azı dişleri Ni-Ti kapalı sarmal yayları yardımıyla mezial yönde hareket ettirilmiştir. **Bulgular:** Sonuçlar histomorfometrik olarak incelenmiş ve trabeküler kemik hacmi (BV/TV), trabeküler kemik sayısı (Tr.N) ve trabeküler ayrıklık (Tr.Sep) değerleri, mandibular birinci azı dişlerin interradikuler alanlarında ölçülmüştür. WinTAS (Trabecular Analyze System, V. 1.2.9) sonucunda, eNOS gruplarında, özellikle 30µg L-NIO dihidroklorid grubunda, BV/TV, Tr.N ve Tr.Sep değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı değişimler gözlenmiştir. **Sonuç:** Bulgular, ortodontik diş hareketi sırasında eNOS'un kemik şekillenmesinde rol oynayan birincil izoenzim olduğunu ve optimum dozunun belli bir aralıkta olduğunu göstermektedir. (*Türk Ortodonti Dergisi 2012;25:242-256*).

Anahtar Kelimeler: eNOS, iNOS, nNOS, diş hareketi.

Gönderim Tarihi: 06.12.2011
Kabul Tarihi: 24.10.2012

SUMMARY

Aim: Many systemic/local factors take part in the process of bone-remodeling. Nitric oxide (NO), an important intercellular signal modulator produced by osteoblasts, is a potent regulator of bone-remodeling. The objective of the study was to investigate the effects of different NO-isoforms on bone-remodeling during orthodontic tooth movement. **Materials and Methods:** 66-male, adult Sprague-Dawley rats were randomly divided into 11 groups to determine the effects of three different NO-synthase (NOS) inhibitors. All NOS-inhibitors (iNOS-inhibitor 1400W-dihydrochloride, eNOS-inhibitor L-NIO-dihydrochloride and nNOS-inhibitor Nω-propyl-L-arginine) were administered in three different doses (10, 30 and 100µg/20µl); the remaining two groups served as control. Mandibular first molars were moved mesially with Ni-Ti closed coil-springs in all groups. **Results:** The results were evaluated histomorphometrically and parameters of trabecular bone volume (BV/TV), trabecular bone number (Tr.N) and trabecular separation (Tr.Sep) were analyzed at the interradicular bone area of the mandibular first molars. The outcomes of the WinTAS (Trabecular Analyze System, V. 1.2.9) revealed statistically significant alterations in BV/TV, Tr.N and Tr.Sep for the eNOS groups, especially for the 30µg L-NIO dihydrochloride group. **Conclusion:** Data suggest that eNOS could be the primary NO-isoenzyme involved in bone-remodeling during orthodontic tooth movement, and optimum dose is in a certain range. (*Turkish J Orthod 2012;25:242-256*).

Key Words: eNOS, iNOS, nNOS, tooth movement.

Date Submitted: 06.12.2011
Date Accepted: 24.10.2012



Dt. Hasan BÜLBÜL*
Doç.Dr. Hüseyin ÖLMEZ**
Doç.Dr. Erol AKIN***
Yrd.Doç.Dr. Sıla MERMUT GÖKÇE**
Doç.Dr. Şeniz KARAÇAY****
Doç.Dr. Mehmet KÜRKCÜ *****

Yazışma adresi:
Corresponding Author:
Dr. Sıla MERMUT GÖKÇE,
Gülhane Askeri Tıp Akademisi,
Dişhekimliği Bilimleri Merkezi,
Gn. Tevfik Sağlam Cad.,
Ankara, Etilik 06018, Türkiye
Tel: 0312 304 60 25
E-mail: silagokce@yahoo.com

*Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Bursa Asker Hastanesi Diş Servisi, Bursa, **Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Dişhek. Bilimleri Merkezi Ortodonti A.D. Ankara, ***Medicana Hastanesi Ortodonti Servisi İstanbul, **** Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Haydarpaşa Eğitim Hastanesi, Ortodonti AD, İstanbul, *****Çukurova Üniv., Dişhek. Fak., Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi A.D., Adana, Türkiye / *Bursa Military Hospital, Dental Service, Bursa, **Gülhane Military Medical Academy, Dental Sciences Center, Dept. of Orthodontics, İstanbul, ***Medicana Hospital, Dept. of Orthodontics, İstanbul, **** Gülhane Military Medical Academy, Haydarpaşa Training Center, Dept. of Orthodontics, İstanbul, ***** Çukurova Univ., Faculty of Dentistry, Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, Adana, Turkey





GİRİŞ

Kemik şekillenmesi, çok çekirdekli osteoklastların gerçekleştirdiği kemik rezorpsiyonunu takip eden, osteoblast kaynaklı kemik oluşumunu içeren, hassas biçimde düzenlenmiş dinamik bir işlemdir (1). Çoğu sistemik ve lokal etkenler (hormonlar, sitokinler, büyüme faktörleri, matriks ürünleri, lipid metabolitleri ve iyonlar), normal ve patolojik koşullarda osteoblast ve osteoklastların güçlenmesi, oluşumu, farklılaşması ve fonksiyonlarını etkileyerek kemik şekillenmesini düzenler (1,2). Günümüzde, multifonksiyonel bir sinyal molekülü olan nitrik oksit (NO), kemik içinde önemli bir interselüler sinyal düzenleyici olarak tanımlanmıştır. Osteoblast çoğalması/idamesi, osteoklast fonksiyonları ve kemik şekillenmesi işlemlerinde önemli görevler üstlenir (2-6).

NO, NO sentezi (NOS) sonucu oluşan L-argininden sentezlenen, üç izoforma sahip, kısa ömürlü bir serbest radikaldir. Bu izoformlar, gen seviyesinde çeşitli enflamatör medyatörler tarafından düzenlenen endotelial NOS (eNOS), nöronal NOS (nNOS) ve indüklenebilen NOS (iNOS)'tur (7-9). NO, kemik metabolizmasında rol oynayan güçlü bir düzenleyicidir (10). In vitro ve in vivo çalışmalar, osteoblastlar aracılığıyla üç izoformdan oluşan NO üretiminin, osteoblast proliferasyona, farklılaşmasına, kemik turn over'ına ve kemik hacmi artışına neden olduğunu ortaya koymuştur (10-20).

Kemik hücrelerindeki NO üretimi, akışkanlardaki makaslama ve gerilme gibi mekanik uyarılara karşı oldukça hassastır (21,22). NOS inhibitörleri tarafından engellenen NO üretiminin, büyüme gelişimi devam eden ratlardaki kemik dokusu kültürlerinde osteoklastogenezi uyardığı ve kemik rezorpsiyonunu artırdığı bildirilmiştir (23,24).

NO ortodontik diş hareketinde önemli rol oynar. NO seviyesindeki düşüş diş hareketinin azalmasına, artışlar ise diş hareketinin hızlanmasına neden olur (25-27). Ayrıca, bu hızlanmaya yeni kapiller oluşumun belirtileri olan çok çekirdekli osteoklastların artışı, Howship lakünleri ve kapiller damarlanma eşlik eder (25).

INTRODUCTION

Bone remodeling is a sensitively regulated dynamic process in which bone resorption by multinucleated osteoclasts is closely followed by osteoblast-mediated bone formation (1). Many systemic and local factors (hormones, cytokines, growth factors, matrix products, lipid metabolites, and ions) regulate bone remodeling under normal and pathological conditions through their effects on the recruitment, formation, differentiation, and function of osteoblast and osteoclasts (1,2). Recently, the multifunctional signal molecule, nitric oxide (NO), was shown to serve as an important intercellular signal modulator in bone. It exerts profound effects on osteoblast proliferation/survival, osteoclast function, and bone remodeling processes (2-6).

NO is a short-lived free radical synthesized from L-arginine by NO synthases (NOS), which has three isoforms. Of the three NOS isoforms, endothelial NOS (eNOS) and neuronal NOS (nNOS) are constitutively expressed, and the other one, inducible NOS (iNOS), is regulated at the gene level by a variety of inflammatory mediators (7-9). NO is a potent regulator of bone metabolism (10). In vitro and in vivo studies revealed that NO production through three NOS isoforms by osteoblasts mediates mechanical stimulation of osteoblast proliferation, differentiation, bone turn over and bone volume (10-20).

NO production in bone cells is enhanced in response to mechanical stimulation such as fluid shear stress and bending (21, 22). Inhibition of NO productions by NO synthase inhibitors has been reported to stimulate osteoclastogenesis in bone tissue cultures and increases bone resorption in growing rats (23, 24).

NO plays an important role in orthodontic tooth movement. Decrease in NO levels leads to a decrease in tooth movement, while increase of NO in the environment increases tooth movement (25-27). This increase is also accompanied by an increase in multinuclear osteoclasts, Howship's lacunae, and capillary vascularization indicating an effect on new capillary formation (25).



Ortodontik diş hareketi ve kemik şekillenmesinde NO önemli bir role sahip olduğu kabul edilmektedir. Bu nedenle, bu çalışmanın amacı etkileri bilinen NOS izoform(lar)ının kemik dokusuna ve ortodontik diş hareketi üzerine etkilerinin incelenmesidir.

GEREÇLER ve YÖNTEM

Bu çalışmada, Gülhane Askeri Tıp Akademisi etik kurulundan hayvan deneyleri yönergesine uygun etik kurul onayı alınmıştır. Çalışma için ortalama 250 g ağırlığa sahip, aynı yaş grubunda 66 erişkin erkek Sprague Dawley rat kullanılmıştır. Ratlar, grupların her birinde 6 adet olacak şekilde rastgele 11 eşit gruba bölünmüştür. 24°C de ısı kontrollü ve 12 saat aydınlık /karanlık döngüsüne sahip mekanlarda standart peletle ve suyla ad libitum beslenmiştir.

Yayların uygulanması öncesinde, Xsilazine HCL (10 mg/kg) (Alfazyne 2%, Egevet, İzmir, Türkiye) ve Ketamin HCL (90 mg/kg) (Alfamine 10%, Egevet, İzmir, Türkiye) kombinasyonu anestezik olarak uygulanmıştır. Aynı kimyasallar, letal dozda sakrifikasyon öncesi de kullanılmıştır. İsoflurane (10mg/kg) inhalasyon anestezisi, inhibitörlerin uygulanması ve diğer prosedürler için kullanılmıştır.

Bütün gruplara ortodontik kuvvet uygulanmıştır. Mandibular azılar ve kesiciler arasına bilateral olarak Ni-Ti kapalı sarmal yaylar (0.305x0.915mm) karşılıklı kuvvet oluşturacak şekilde yerleştirilip 0.008" kalınlığında paslanmak çelik tel ile bağlanmıştır (Şekil 1). 60g lık karşılıklı kuvvet, kuvvetölçer (Correx tension gauge, İsviçre) ile ölçülüp çalışma sonuna kadar tekrar aktive edilmemiştir. Yayların uygulanması esnasında oluşabilecek travma sonrası enfeksiyondan korunma amaçlı, Colisillin (0.1 ml/kg) (100 mg/ml Ampicillin + 250.000 IU/ml Colistin Sulphate, Egevet, İzmir, Türkiye) uygulanmıştır. Çalışma, Gülhane Askeri Tıp Akademisi deney hayvanları kullanım yönergesine uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Çalışma grupları üç farklı konsantrasyonda, üç NOS inhibitöründen oluşmaktadır. Üç NOS inhibitörü de (Tocris Cookson Ltd., Bristol, Birleşik Krallık) hedeflerine karşı yüksek miktarda seçici

NO has been suggested to have an important role in bone remodeling and orthodontic tooth movement. Therefore, the aim of this study was to evaluate the influence of the well known NOS isoforms on bone tissue and to determine the effective NOS isoform(s) during orthodontic tooth movement.

MATERIALS and METHOD

The animal experimental protocol in this study was approved by the Ethics Committee for Animal Experiments at the Gulhane Military Medical Academy. The study comprised 66 adult, male Sprague Dawley rats of approximately the same age with an average weight of 250 grams. The rats were randomly divided into 11 equal groups, being 6 rats in each. The animals were fed a standard pellet diet with tap water at libitum and were adapted to a 12/12-hour light/dark cycle.

The rats were anesthetized with a combination of Xsilazine HCL (10 mg/kg) (Alfazyne 2%, Egevet, Izmir, Turkey) and Ketamin HCL (90 mg/kg) (Alfamine 10%, Egevet, Izmir, Turkey) before the application of the springs. The same chemicals were also used at lethal dose prior to sacrifice. Isoflurane inhalation anesthetic (10mg/kg) was used during the injection of the inhibitors and before various procedures.

Orthodontic force was administered to all groups. Ni-Ti closed coil springs (0.305x0.915mm), exerting approximately 60 g of reciprocal force were applied bilaterally between the mandibular first molars and incisors at each side cleat by a 0.008 inch stainless steel ligature wire (Figure 1). The 60 g of reciprocal force was measured with a gauge (Correx tension gauge, Switzerland), and the springs were not reactivated during the experiment. Prophylactic antibiotic, Colisillin (0.1 ml/kg) (100 mg/ml Ampicillin + 250.000 IU/ml Colistin Sulphate, Egevet, Izmir, Turkey) was administered for once to prevent infection that could be resulted by trauma during application of springs. The experiment was carried out according to the guidelines of Gülhane Military Medical Academy for the use of experimental animals.





Şekil I. Ni-Ti kapalı sarmal yay (0.305x0.915 mm) ile, bilateral mandibular birinci molar ve kesiciler arasında ortalama 60 g resiprokal kuvvet uygulanması.

Figure I. Orthodontic force was administered via Ni-Ti closed coil springs (0.305x0.915 mm), exerting approximately 60 g of reciprocal force applied bilaterally between the mandibular first molars and incisors.



karakterdedir. İnhibitörlerin her biri, % 0,9'luk NaCl solüsyonunda çözünmüş ve 10, 30 ve 100µg /µl olacak şekilde üç farklı konsantrasyonda hazırlanmışlardır. 60 g lık ortodontik kuvvet eşliğinde, Grup 1,2 ve 3'te sırasıyla 10, 30 ve 100µg/µl iNOS 1400W dihidroklorid (1400W) inhibitörü günde iki sefer olacak şekilde uygulanmıştır. Grup 4, 5 ve 6'da, eNOS L-NIO dihidroklorit (L-NIO) inhibitörü sırasıyla aynı şekilde ve aynı doz oranında uygulanmıştır. Yine aynı şekilde ve aynı dozda, nNOS Nω-propyl-L-arginine (NPLA) inhibitörü sırasıyla Grup 7, 8 ve 9 da uygulanmıştır. Son iki grup, kontrol grubu olarak belirlenmiştir. Grup 10'a da % 0,9'luk NaCl solüsyonu aynı miktarda ve benzer şekilde uygulanmıştır (20µl/24 saat). Grup 11'e sadece ortodontik kuvvet uygulanmıştır. Deneysel solüsyonlar sağ ve sol alt birinci azının meziobukkal subperiosteal bölgelerine enjekte edilmiştir. Ratlar, deney süresinde gözlenmiş ve 7. günde sakrifasyon gerçekleştirilmiştir. Daha sonra, mandibulaları disseke edilip 0.1 M fosfat ilave edilmiş 2.5 %'lik glutaraldehit solüsyonunda fikse edilmiştir.

Kemik Histomorfometrisi

Histolojik kesitler, Cutting-Grinding tekniği kullanılarak hazırlanmıştır (28). Mandibulalar, artan seri etanol konsantrasyonları ile dehidrate edilmiştir. Dehidratasyon sonrasında örnekler, örnekler

The study groups consisted of three NOS inhibitors in three different concentrations. All three NOS inhibitors (Tocris Cookson Ltd., Bristol, UK) were highly selective against their targets. Each were dissolved in 0.9 % NaCl and prepared at three different concentrations, as 10, 30 and 100µg /µl. In the Group 1, 2 and 3; 10, 30 and 100µg/µl iNOS inhibitor 1400W dihydrochloride (1400W) was administered twice a day with 60 g of orthodontic force. In the Group 4, 5 and 6; eNOS inhibitor L-NIO dihydrochloride (L-NIO) was administered with the same sequence and dose, respectively. The same sequence and dose were also used for the administration of nNOS inhibitor Nω-propyl-L-arginine (NPLA) in the Group 7, 8 and 9. The last 2 groups were evaluated as control groups. In the Group 10, 0.9 % NaCl solution was administered with the same amount and prescription (20µl/24 hours). Only orthodontic force was administered in the Group 11. The experimental solutions were injected into the mesiobuccal subperiosteal area adjacent to the left and right lower first molars. The rats were monitored during the experiment and were sacrificed on the 7th day of the experiment. Mandibulae were dissected and placed in 0.1 M phosphate-buffered 2.5 % glutaraldehyde solution for fixation.



etanol-metil metakrilat karışımına maruz bırakılarak plastik infiltrasyonu gerçekleştirilmiştir. Plastik infiltrasyonu tamamlanan doku örnekleri, Technovit 7.200 VLC (Heraeus-Kulzer GmbH & Co. KG, Hanau, Almanya) eklenen kalıplara gömülmüş ve son polimerizasyon işlemi tamamlanmıştır. Polimerize doku blokları, yaklaşık 10 µm kalınlığında olacak şekilde hazırlanmıştır. Kesitler, 10 % H2O2 solüsyonunda 5 dakika boyunca yıkanmış, su ile durulanıp kurutulduktan sonra Toluidine mavisi ile sabitlenmiştir.

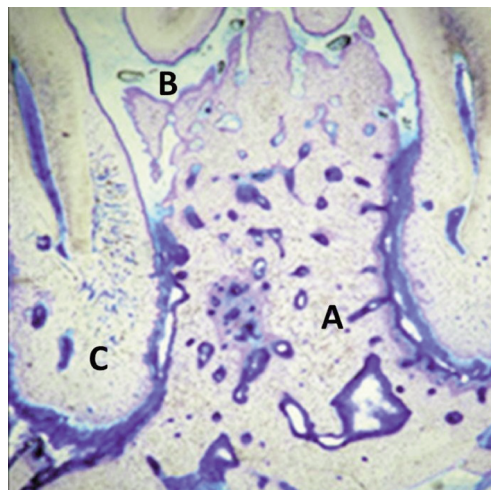
Bütün kesitler Olympus ışık mikroskobu (Olympus Optical Co, Tokyo, Japonya) ile incelenmiş ve normalden 4 kat büyütülmüş görüntüler bilgisayar ortamına WinTAS (Trabecular Analyze System, V. 1.2.9) yazılımı ile incelenmek üzere taşınmıştır (Steve Paxton, University of Leeds, Leeds, UK) (Şekil 2-6).

Birinci azıların interradiküler (servikal, orta, apikal) alanlarında üç farklı ölçüm yapılmıştır. Standardizasyon için, birinci azıların mezial ve distal kökleri arasındaki bölge interradiküler alan olarak belirlenmiştir. Servikal, orta ve apikal interradiküler alanların tanımlanması için, bifurkasyon ve kök ucu üç eşit bölgeye bölünmüştür. Interradiküler alanların konik forma sahip olmalarından dolayı kompakt ve spongiöz kemik alanları oranları farklılık göstermektedir. Güvenilir bilgi elde etmek amacıyla interradiküler bölgede üç ayrı yerde ölçüm yapılmış ve bunların ortalama değeri alınmıştır. Ölçümler, iki kez tekrarlanarak hesaplanmıştır ve ölçümlerin ortalaması hesaplanmıştır. Bütün ölçümler ve hesaplamalar, Amerikan Kemik ve Mineral Araştırmaları Derneği isimlendirme kılavuzuna uygun olarak gerçekleştirilmiştir (29). Kemik histomorfometri için geliştirilen bilgisayar yazılımı ile trabeküler kemik hacmi (BV/TV), trabeküler kemik sayısı (Tr.N) ve trabeküler ayrıklık (Tr.Sep) ölçülmüştür. BV/TV (%), seçilen bölgedeki mineralize ve non mineralize kemik hacminin toplam kemik hacmine oranıdır. Tb.N, seçili bölgedeki trabeküler kemik sayısıdır. Tb.Sep (µm) toplam trabeküler kemik miktarının çıkartılmasından sonra kemik hacminden geriye kalan miktarı ifade eder.

Bone Histomorphometry

Preparation of histological sections was performed according to the "Cutting-Grinding Technique" (28). Mandibulae were dehydrated by using increasing ethanol concentrations. After dehydration, specimens were exposed to plastic infiltration using an increasing mixture of ethanol-methyl methacrylate. The plastic-infiltrated tissue slices were placed in embedding molds, Technovit 7.200 VLC (Heraeus-Kulzer GmbH & Co KG, Hanau, Germany) was added, and final polymerization process was accomplished. The polymerized tissue blocks were prepared and a tissue thickness of approximately 10 µm was obtained. The sections were agitated in 10 % H2O2, rinsed in water, wiped dry and stained in Toluidine blue solution. All sections were evaluated using an Olympus light microscope (Olympus Optical Co, Tokyo, Japan), and x4 images were transferred to a computer and evaluated utilizing WinTAS (Trabecular Analyze System, Ver. 1.2.9) program (Steve Paxton, University of Leeds, Leeds, UK) (Figure 2-6).

Three different measurements in the interradicular area of the first molars, (cervical, middle and apical) were performed. For the standardization, the interradicular area of the first molar was defined as the area between the mesial and distal roots of the molar. In order to define the cervical, middle and apical interradicular area, the area between the bifurcation and root apex was divided into three equal areas. As the interradicular areas were in conic



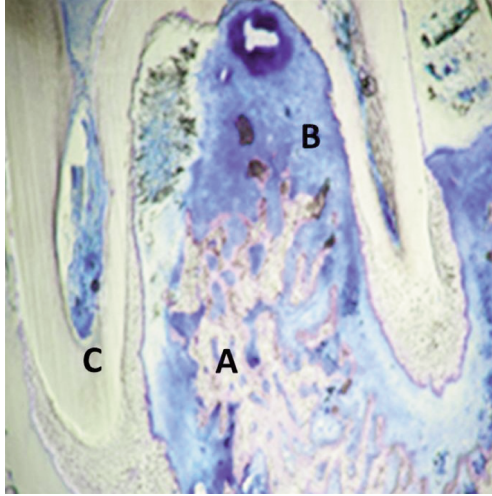
Şekil II. iNOS grubunun histolojik kesiti (Grup 2); A) trabeküler kemik, B) kemik rezorbsiyon alanı, C) birinci molar dişin kökü.

Figure II. Histological section of iNOS group (Group 2); A) trabecular bone, B) bone resorption area, C) root of the first molar.



Şekil III. eNOS grubunun histolojik kesiti (Grup 5); A) trabeküler kemik, B) kemik rezorpsiyon alanı, C) birinci molar dişin kökü.

Figure III. Histological section of eNOS group (Group 5); A) trabecular bone, B) bone resorption area, C) root of the first molar.



İstatiksel Metod

İstatiksel ölçümler SPSS10.0 (SPSSFW, SPSS Inc., Chicago, IL., ABD) yazılım paketiyle gerçekleştirilmiştir. Tanımlayıcı istatistik değerleri ortalama \pm standart sapma ile gösterilmiştir (Tablo 1). Bütün gruplar arasındaki farklar, Kruskal-Wallis testi yardımıyla incelenmiştir ve kontrol grupları (Grup 10 ve 11) ile NOS inhibitörleri (Grup 1-9) arasındaki farklar Mann-Whitney U testi yardımıyla belirlenmiştir (Tablo2-6). 0.05 ten az ya da eşit P değerleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (30).

BULGULAR

Grup İçindeki Farklılıkların Karşılaştırılması

Kemik şekillenmesi ve ortodontik diş hareketi sırasında her bir gruptaki en uygun dozun belirlenmesi için, grup içinde karşılaştırmalar gerçekleştirilmiştir. Grup içindeki farklılıklar değerlendirildiğinde, iNOS (Grup 1, 2 ve 3 arasında), nNOS (Grup 7, 8 ve 9 arasında) ve kontrol gruplarında (Grup 10 ve 11 arasında) bütün parametrelerde istatistiksel olarak anlamsız farklılıklar tespit edilmiştir. Belirgin istatistiksel farklılıklar sadece eNOS grupları arasında gözlenmiştir (Grup 4, 5 ve 6). Grup 5 ile Grup 4 ($P < .001$) ve Grup 6 ($P < .05$) kıyaslandığında, Grup 5 teki BV/TV ve Tr.N azalması ve Tr.Sep artışı önemli bulunmuştur. Grup 6 ve Grup 4 kıyaslandığında ise, ölçülen parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (Tablo 3).

Gruplar Arası Farkların Karşılaştırılması

Kemik şekillenmesinde esas rol oynayan NO izoenzimin belirlenmesi için, iNOS

form, the compact and spongiöse bone ratios were variable. To obtain a reliable data, the measurements were performed from three different area of the interradicular area and mean values of these three measurements were used. Measurements were repeated twice and mean values were calculated. All measurements and calculations were done following the American Society for Bone and Mineral Research nomenclature and guidelines (29). Trabecular bone volume (BV/TV), trabecular bone number (Tr.N) and trabecular separation (Tr.Sp) was measured using the software package developed for bone histomorphometry. BV/TV (%) is the ratio of the mineralized and not mineralized bone volume to the total bone volume in the selected region. Tb.N is the number of the trabecular bone in the selected region. Tb.Sp (μm) is the area left after subtracting the trabecular bone amount from total bone volume.

Statistical Method

The statistics were performed by SPSS 10.0 (SPSSFW, SPSS Inc., Chicago, IL.,USA) Statistical package. Descriptive statistics were shown as mean + standard deviation (Table 1). The differences between all groups were investigated by Kruskal-Wallis test and, the differences between NOS inhibitors (Group 1-9) and control groups (Group 10 and 11) were determined with Mann-Whitney U test (Table 2-6). P values less than or equal to 0.05 were evaluated as statistically significant (30).

RESULTS

Comparison of Intra-Group Differences

In order to determine the optimum dose in bone remodeling during orthodontic tooth movement in each group, the intra-group comparisons have been done. In the comparison of intra-group differences, statistically insignificant alterations were observed in all parameters in iNOS (between Group 1, 2 and 3), nNOS (between Group 7, 8 and 9) and control groups (between Group 10 and 11). Statistically significant differences were observed only between eNOS groups (Group 4, 5 and 6). Decreases



(Grup 1, 2 ve 3), eNOS (Grup 4, 5 ve 6), nNOS (Grup 7, 8 ve 9) ve kontrol grupları (Group 10 and 11) arasında karşılaştırmalar yapılmıştır.

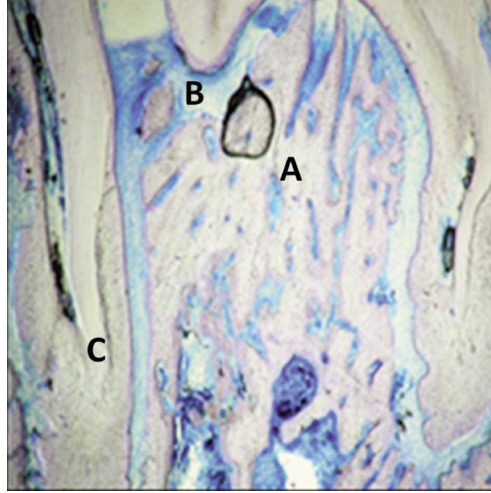
iNOS grupları (Grup 1, 2 ve 3) ile eNOS grupları (Grup 4, 5 ve 6), nNOS (Grup 7, 8 ve 9) ve kontrol grupları karşılaştırıldığında; sadece Grup 1 (sırasıyla $P<.05$, $P<.001$ ve $P<.001$); Grup 2 ($P<.001$) ve Grup 3'e (sırasıyla $P<.05$, $P<.05$ ve $P<.001$) karşı Grup 5'te gözlenen BV/TV ve Tr.N azalması ve Tr.Sep artışı istatistiksel olarak anlamlıdır. iNOS grupları ile eNOS grupları (Grup 5 dışında), nNOS ve kontrol grupları kıyaslandığında, BV/TV, Tr.N ve Tr.Sep değişimleri istatistiksel olarak anlamsız bulunmuşlardır.

eNOS grupları (Grup 4, 5 ve 6) ile nNOS ve kontrol grupları karşılaştırıldığında, Grup 5 dışında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunmamıştır. Grup 5 ile nNOS ve kontrol grupları karşılaştırıldığında, Grup 7, 8, 9, 10 ve 11 de gözlenen BV/TV artışı (Sırasıyla $P<.05$, $P<.05$, $P<.001$, $P<.05$ ve $P<.05$) istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ayrıca, Grup 5 ile Grup 7, 8, 9, 10 ve 11 karşılaştırıldığında, Tr.N artışı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Sırasıyla $P<.01$, $P<.05$, $P<.001$, $P<.001$ ve $P<.01$). Bunlara ek olarak, Grup 5 ile nNOS ve kontrol grupları karşılaştırıldığında, Grup 7, 8, 9, 10 ve 11 de gözlenen Tr.Sep azalması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P<.001$) (Tablo 5).

nNOS grupları (Grup 7, 8 ve 9) kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, ölçülen parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunmamıştır (Tablo 6).

TARTIŞMA

NO, NOS tarafından üretilir ve kemik hücre işleyişinin düzenlenmesinde önemli rol oynar (2-6, 21,22). Bu çalışmada, farklı NOS izoformlarının ortodontik diş hareketi ve kemik şekillenmesi üzerine etkileri incelenmiştir. Ratlar üzerinde çalışmanın kolaylığı ve uygulanan kuvvete hızlı cevap alınması, bizleri ratlar üzerinde çalışmaya yönlendirmiştir (32-34, 43, 44). Dişi ratlarda kısa aralıklarla gözlenen hormonal değişikliklerden dolayı, çalışmamızda erkek rat kullanılmıştır (31, 43, 44). Daha önceki çalışmalarda, ratlara uygulanan ortodontik kuvvet farklı şekilde, farklı dişlere uygulanmıştır (32, 34-36, 43, 44). Bu



Şekil IV. nNOS grubunun histolojik kesiti (Grup 8); A) trabeküler kemik, B) kemik rezorpsiyon alanı, C) birinci molar dişin kökü.

Figure IV. Histological section nNOS group (Group 8); A) trabecular bone, B) bone resorption area, C) root of the first molar.

in BV/TV and Tr.N and, increase in Tr.Sep in Group 5 were significant in the comparison of Group 5 against Group 4 ($P<.001$) and Group 6 ($P<.05$). When Group 6 and Group 4 were compared, no statistically significant changes were observed in measured parameters (Table 3).

Comparison of Between-Group Differences

In order to determine the primary NO isoenzyme in bone remodelling, the comparisons have been done between iNOS (Group 1, 2 and 3), eNOS (Group 4, 5 and 6), nNOS (Group 7, 8 and 9) and control groups (Group 10 and 11).

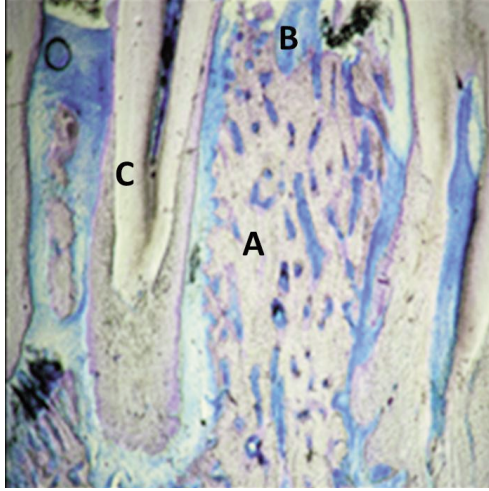
In the comparison of iNOS groups (Grup 1, 2 and 3) against eNOS, nNOS and control groups; only decreases in BV/TV and Tr.N and, increase in Tr.Sep in Group 5 were statistically significant against Group 1 ($P<.05$, $P<.001$ and $P<.001$, respectively); Group 2 ($P<.001$) and Group 3 ($P<.05$, $P<.05$ and $P<.001$, respectively). The changes in BV/TV, Tr.N and Tr.Sep were statistically insignificant in the comparison of the iNOS groups against eNOS (except Group 5), nNOS and control groups (Table 4).

When eNOS groups (Group 4, 5 and 6) were compared against the nNOS and control groups; the changes related to the parameters were statistically not significant except Group 5. In the comparison of Group 5 against nNOS and control groups; the increase in BV/TV in Group 7, 8, 9, 10 and 11 were statistically significant ($P<.05$,



Şekil V. Salin+Kuvvet grubunun histolojik kesiti (Grup 10); A) trabeküler kemik, B) kemik rezorpsiyon alanı, C) birinci molar dişin kökü.

Figure V. Histological section of Saline+Force group (Group 10); A) trabecular bone, B) bone resorption area, C) root of the first molar.



çalışmada, kapalı sarmal yaylar daha önceki çalışmalara (43, 44) benzer şekilde azı ve kesici dişler arasına uygulanmıştır. Kuvvet uygulanması için oluşturulan retansiyon alanları, gingival enflamasyona neden olmaktadır (32-36). Sonuç olarak, kemik rezorpsiyonunda rol oynayan medyatörler salınmış ve osteoklastik aktivite oluşturulmuştur. Şekli kadar uygulama kolaylığı da olan kuvvet mekanikleri, travma, ödem ve enfeksiyon riski oluşturmaktadır. Bu olasılığı elimine etmek için, işlemler öncesi bir doz profilaktik antibiyotik bütün ratlara uygulanmıştır (43,44).

Otero ve ark. (33), ratlarda deneysel diş hareketlerini araştırmış ve 36. saatin sonunda hareketin sonlandığını tespit etmiştir. Otero ve ark (33)'na göre, hyalin dejenerasyonu 48. saatte oluşmuş ve rezorpsiyon alanları en yüksek seviyeye ulaşmıştır. 60. saatte, osteoklast miktarları en yüksek değerlere ulaşmış ve 72. saatte rezorpsiyon alanları azalmaya başlamıştır. 84. ve 108. Saatler arasında, rezorpsiyon alanları ve osteoklast sayılarında önemsiz azalmalar gözlenmiştir (33). Bu araştırmaya göre, bizim çalışmamızın, hareket eden dişin etrafında stabil bölgesel çevrenin sağlanması için 108 saatten uzun sürmesi kararlaştırılmıştır. Ratlar üzerinde gerçekleştirilen deneysel diş hareketinin incelendiği benzer çalışmalar incelendiğinde, yapılan bu çalışmada deney süresinin 7 gün olmasına ve yaklaşık 60 g kuvvet uygulanmasına karar verilmiştir. Daha önceki çalışmalarda çağdaş bir metot olarak tercih edilen Cutting-Grinding tekniği kullanılarak histolojik kesitler hazırlanmıştır (11, 18, 20, 26, 28, 29, 43, 44).

$P<.05$, $P<.001$, $P<.05$ and $P<.05$, respectively). The increase in Tr.N in Group 7, 8, 9, 10 and 11 were also statistically significant compared to Group 5 ($P<.01$, $P<.05$, $P<.001$, $P<.001$ and $P<.01$, respectively). In addition, in the comparison of Group 5 against nNOS and control groups, the decrease in Tr.Sep in Group 7, 8, 9, 10 and 11 were statistically significant ($P<.001$) (Table 5).

When nNOS groups (Group 7, 8 and 9) were compared against the control groups; no statistically significant differences were determined in measured parameters (Table 6).

DISCUSSION

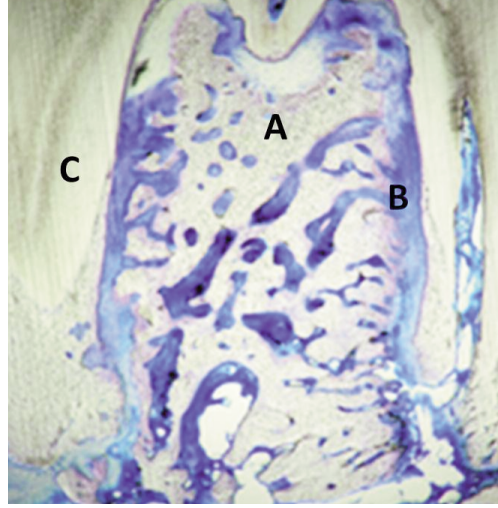
NO is produced by NOS and plays an important role in the regulation of bone cell function (2-6, 21, 22). The present study evaluated the effects of different NOS isoforms on bone remodeling in orthodontic tooth movement. In order to be easy to study with rats and quick response to applicated force, we preferred to study with rats (32-34, 43, 44). Since the short cyclus in female rat causes hormonal variations, our study was carried out with male rats (31, 43, 44). In previous studies, orthodontic force was exerted by different modalities to different teeth of the rat (32, 34-36, 43, 44). In current study, orthodontic force was exerted by closed coil springs between the molars and incisors similar with previous studies (43, 44). The mechanics used for force application creating retention points, causes gingival inflammation (32-36). As a result, mediators that are effective in bone resorption and osteoclastic activity were excreted. As easy as it is designed the application of force mechanics lead to the risk of trauma, edema and infection. To eliminate these probabilities, one dose prophylactic antibiotic was administered to all rats (43, 44).

Otero et al. (33) investigated the experimental tooth movement in rats and they determined the movement ended at the 36th hour. According to Otero et al. (33), hyaline degeneration occurred at 48th hour and the resorption areas reached their maximum levels. At 60th hour, the amount of



Watanuki ve ark (19), iNOS geni eksik olan farelerde (KO) immunohistokimyasal araştırmalar yapmışlardır. Farelerdeki proksimal tibiaların histo morfometrik analizleri, bütün iNOS genotiplerinde 7 gün sonunda kemik hacminin (BV/TV) , kemik oluşum oranının (BFR/BS) azaldığını ve osteoklast yüzey artışına (Oc.S/BS) neden olduğunu göstermiştir. Mevcut çalışmamızda TAS analizi sonuçları yorumlandığında, BV/TV, Tr.N ve Tr.Sep için iNOS grupları ve kontrol grupları karşılaştırıldığında ortaya çıkan önemsiz değişiklikler, ortodontik diş hareketinden sorumlu esas enzimin iNOS olmadığını göstermektedir. Hayashi ve ark.(26), NO'ın ratlarda ortodontik diş hareketinde üstlendiği rolü incelemişler ve NOS için spesifik inhibitörler kullanmışlar. Araştırmacılar, genel bir NOS inhibitörü olan N(G)-nitro-L-arginine methyl ester HCl (L-NAME)'in lokal olarak uygulandığında, önemli bir şekilde diş hareketini azalttığını; ancak NOS'un inkülenebilir izoformu için seçici bir inhibitör olan N(6)-(1-iminoethyl)-L-lysine 2HCl (L-NIL)'in uygulandığında bir etkisinin olmadığını belirtmişlerdir. Hayashi ve ark.(26), NO'in esas olarak periodontal dokudaki eNOS aktivitesi sonucu üretildiğini bildirmişlerdir. Bu sonuç bizim bulgularımıza benzerlik göstermektedir. Bizim bulgularımızın aksine, osteoblastlardaki iNOS tarafından üretilen NO'in, kemik turn over'ının düzenlenmesinde önemli rol üstlenmekte olduğu ve akut mekanik yüklemeye artan bir osteojenik aktivite cevabı gösterdiği belirtilmiştir (19). Diğer taratan, iNOS aktivasyonunun osteoblast aktivitesini önemli ölçüde azalttığına dair çalışmalar mevcuttur (1). Ancak bu çalışmada iNOS üç farklı dozda kullanılmasına rağmen, ortodontik diş hareketi üzerine belirgin bir etkisi olmamıştır.

Bu çalışmada, nNOS gruplarındaki BV/TV, Tr.N and Tr.Sep değerlerindeki farklılıklar, diğer deney ve kontrol gruplarıyla kıyaslandığında önemsiz bulunmuşlardır. Bu sonuçlar bizlere nNOS inhibisyonunun, deneysel diş hareketi sırasında mekanik yüklemeye esnasında kemik dokusu cevabında herhangi bir değişikliğe neden olmadığını göstermektedir. Van't Hof ve ark. (18), nNOS geninin spesifik inaktivasyonu yapılmış farelerde, nNOS'un kemik metabolizması



Şekil VI. Kuvvet grubunun histolojik kesiti (Grup 11); A) trabeküler kemik, B) kemik rezorpsiyon alanı, C) birinci molar dişin kökü.

Figure VI. Histological section of Force group (Group 11); A) trabecular bone, B) bone resorption area, C) root of the first molar.

osteoclasts reached their maximum values and at 72nd hour the resorption areas began to decrease. Between 84th and 108th hours, insignificant reduction occurred related to the resorption areas and osteoclast numbers (33). According to that study, it was determined that our study had to continue more than 108 hours in order to obtain a stable local environment around the moved teeth. Based on previous studies related to experimental tooth movement in rats (43-45) it was chosen an experimental period of 7 days and a force level of approximately 60 g. Preparation of histological sections was performed according to the "Cutting-Grinding Technique", which was preferred as a contemporary technique in previous studies (11, 18, 20, 26, 28, 29, 43, 44).

Watanuki et al. (19) examined iNOS gene knockout (KO) mice in the tail-suspension model. Histomorphometric analyses of proximal tibiae revealed that 7 days of tail suspension decreased the bone volume (BV/TV) and bone formation rate (BFR/BS) and increased the osteoclast surface (Oc.S/BS) in mice with all iNOS genotypes. When the outcomes of the TAS analysis in the current study were interpreted; the insignificant alterations in iNOS groups compared to control groups for BV/TV, Tr.N and Tr.Sep revealed the possibility that the main responsible enzyme in orthodontic tooth movement is not iNOS. Hayashi et al. (26) examined the role of NO in orthodontic tooth movement in rats and they used specific inhibitors of NOS. The authors



Tablo I. Tüm grupların Trabeküler Kemik Hacmi, Trabeküler Kemik Sayısı ve Trabeküler Ayrıklık parametrelerinin tanımlayıcı istatistikleri.

Table I. Descriptive Statistics of Trabecular Bone Volume, Trabecular Bone Number and Trabecular Separation for all Groups.

Gruplar/ Groups	BV/TV		Tb.N		Tb.Sep	
	X	SS	X	SS	X	SS
Grup 1 / Group 1	15.975	4.909	19.235	6.609	62.020	11.670
Grup 2 / Group 2	19.743	4.368	19.312	4.506	63.527	10.997
Grup 3 / Group 3	17.756	7.344	17.097	9.268	66.682	14.923
Grup 4 / Group 4	19.341	6.638	22.296	6.293	61.826	10.101
Grup 5 / Group 5	10.675	4.116	10.544	3.095	104.706	17.272
Grup 6 / Group 6	16.400	6.760	16.109	9.718	66.536	7.165
Grup 7 / Group 7	17.867	9.714	20.961	10.282	62.595	4.812
Grup 8 / Group 8	15.653	7.793	16.211	7.676	61.935	6.471
Grup 9 / Group 9	17.803	3.974	17.989	3.519	62.151	6.184
Grup 10 / Group 10	17.165	8.654	19.494	5.887	64.329	13.937
Grup 11 / Group 11	18.225	12.783	19.168	8.661	64.800	12.994

BV/TV: Trabeküler Kemik Hacmi, Tr.N: Trabeküler Kemik Sayısı, Tr.Sep: Trabeküler Ayrıklık, X : Ortalama, SS: Standart Sapma. / BV/TV: Trabecular Bone Volume, Tr.N: Trabecular Bone Number, Tr.Sep: Trabecular Separation, X : Mean, SD: Standard deviation.

Tablo II. Tüm grupların Kruskal-Wallis testi.

Table II. Kruskal-Wallis test of all groups.

	χ^2	p	Anlamlılık / Sig.
BV/TV	16.690	0.082	ÖD / NS
Tb.N	20.692	0.023	*
Tb.Sep	43.402	<0.001	***

BV/TV: Trabeküler Kemik Hacmi, Tr.N: Trabeküler Kemik Sayısı, Tr.Sep: Trabeküler Ayrıklık. / BV/TV: Trabecular Bone Volume, Tr.N: Trabecular Bone Number, Tr.Sep: Trabecular Separation, Sig: Significance
* P < .05, *** P < .001, ÖD: Önemli Değil. / NS: not significant.

üzerine etkilerini araştırmışlardır. Bizim bulgularımızın aksine, nNOS olmayan farelerde, kontrol gruplarıyla kıyaslandığında trabeküler kemik hacminde % 67'lik bir artış, kortikal ve trabeküler kemik kalınlıklarında % 10 oranında artış bulunmuştur (18). eNOS ve nNOS, kemikteki en etkili NOS enzimleridir (37-39); ancak Van't Hof ve ark.(18)'nin çalışmasında nNOS geni inaktivasyonuna bağlı olarak nNOS'un, kemik turn over'ında daha aktif rol oynayabileceği sonucu çıkmaktadır. Yakın gelecekte, eNOS ve nNOS KO deneklerde, bu iki izoformdan hangisinin diş hareketinde daha etkin rol oynadığının araştırılmasının yararlı olacağı düşünülmektedir.

TAS analizinin sonuçları eNOS gruplarında; özellikle Grup 5 (30µg) diğer gruplarla kıyaslandığında, BV/TV, Tr.N ve Tr.Sep değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı değişiklikler göstermiştir. Grup 5'te gözlenen BV/TV, Tr.N düşüşü ve Tr.Sep artışı, hem grup

determined that the local administration of N(G)-nitro-L-arginine methyl ester HCl (L-NAME), a general inhibitor of NOS activity, significantly reduced tooth movement, whereas N(6)-(1-iminoethyl)-L-lysine 2HCl (L-NIL), a selective inhibitor of the inducible isoform of NOS, had no effect. The observation of Hayashi et al. (26) revealed that NO is produced primarily through the activity of eNOS in periodontal tissue. That outcome is in accordance with our results. Contrary to our findings, it was also suggested that NO generated by iNOS in osteoblasts plays a critical role in adjusting bone turnover and increasing osteogenic activity in response to the acute increase in mechanical loading (19). On the other hand, there are studies, which show that iNOS activation significantly inhibits osteoblast activity (1). Although iNOS was used in three different doses in the present study, there was no



Gruplar/ Groups	Parametreler/ Parameters	OF/ MD	SH/ SE	Z	p	Anlamlılık/ Sig
iNOS	BV/TV	-3.768	2.078	-1.813	0.087	NS
	1-2 Tb.N	-0.077	2.530	-0.030	0.976	NS
	Tb.Sep	-1.507	5.071	-0.297	0.770	NS
	BV/TV	-1.781	2.794	-0.638	0.532	NS
	1-3 Tb.N	2.138	3.600	0.594	0.560	NS
	Tb.Sep	-4.662	5.991	-0.778	0.447	NS
	BV/TV	1.987	2.702	0.735	0.472	NS
	2-3 Tb.N	2.215	3.259	0.680	0.505	NS
	Tb.Sep	-3.155	5.862	-0.538	0.597	NS
eNOS	BV/TV	8.666	2.470	3.913	0.001	***
	4-5 Tb.N	11.752	2.218	5.299	0.001	***
	Tb.Sep	-42.880	6.327	-7.121	0.001	***
	BV/TV	2.941	2.996	1.316	0.205	NS
	4-6 Tb.N	6.187	3.661	1.690	0.108	NS
	Tb.Sep	-4.710	4.653	-0.642	0.456	NS
	BV/TV	-5.725	2.503	-2.287	0.035	*
	5-6 Tb.N	-5.565	3.225	-1.726	0.046	*
	Tb.Sep	38.170	5.913	6.455	0.001	***
nNOS	BV/TV	3.429	3.938	0.871	0.395	NS
	7-8 Tb.N	4.749	4.057	1.342	0.196	NS
	Tb.Sep	0.660	2.550	0.259	0.799	NS
	BV/TV	0.064	3.319	0.019	0.985	NS
	7-9 Tb.N	2.972	3.436	0.865	0.398	NS
	Tb.Sep	0.444	2.478	0.179	0.860	NS
	BV/TV	-3.364	2.766	-1.216	0.240	NS
	8-9 Tb.N	-2.472	2.670	-0.926	0.367	NS
	Tb.Sep	-0.216	2.830	-0.076	0.940	NS
Kontrol/ Control	BV/TV	-1.060	4.882	-0.217	0.830	NS
	10-11 Tb.N	0.325	3.312	0.098	0.923	NS
	Tb.Sep	-0.471	4.026	-1.743	0.098	NS

BV/TV: Trabeküler Kemik Hacmi, Tr.N: Trabeküler Kemik Sayısı, Tr.Sep: Trabeküler Ayrıklık, OF: Ortalama Fark, SH: Standart Hata. / BV/TV: Trabecular Bone Volume, Tr.N: Trabecular Bone Number, Tr.Sep: Trabecular Separation, MD: Mean difference, SE: Standard error, Sig: Significance.
* P < .05, *** P < .001, NS: not significant.

Tablo III. Trabeküler Kemik Hacmi, Trabeküler Kemik Sayısı ve Trabeküler Ayrıklık parametrelerinin grup içi farklılıklarının karşılaştırılması.

Table III. Comparison of Intra-group Differences for Trabecular Bone Volume, Trabecular Bone Number and Trabecular Separation.

içi ve hem de gruplar arası karşılaştırmalarda istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu bilgiler bizlere, eNOS'un kemik metabolizmasında önemli bir rol üstlendiğini ve etkilerinin doğrudan kemik oluşumuna neden olabileceğini göstermektedir. Deneysel diş hareketi sırasında bu etkilerin gözlenmiş olması, bizleri eNOS'un ortodontik diş hareketinde birincil NOS enzimi olduğu sonucuna varmamızı sağlamaktadır.

Fizyolojik koşullarda eNOS, NO aktivasyonuna neden olur ve kemik formasyonunu düzenler (20, 39, 40).

significant effect in orthodontic tooth movement.

In nNOS groups, the alterations in BV/TV, Tr.N and Tr.Sep were not significant according to the other experimental and control groups in the current study. These results suggested that inhibition of nNOS did not alter bone tissue responses to mechanical loading during experimental tooth movement. Van't Hof et al. (18) investigated the role of nNOS in bone metabolism by studying mice with targeted inactivation of the nNOS gene. Contrary to our findings, in nNOS KO mice, there is a 67% increase in





Tablo IV. Trabeküler Kemik Hacmi, Trabeküler Kemik Sayısı ve Trabeküler Ayrıklık parametrelerinin gruplar arası farklılıklarının (iNOS ile eNOS, nNOS ve Kontrol Grupları arasında) karşılaştırılması.

Table IV. Comparison of Between-Group Differences (between iNOS and eNOS, nNOS, Control Groups) for Trabecular Bone Volume, Trabecular Bone Number and Trabecular Separation.

Gruplar / Groups	Parametreler/ Parameters	OF / MD	SH / SE	Z	p	Anlamlılık/ Sig
1-4	BV/TV	-4.366	2.611	-1.672	0.112	NS
	Tb.N	-3.061	2.886	-1.061	0.303	NS
	Tb.Sep	0.194	3.886	0.053	1.083	NS
iNOS (10µg/µl) vs eNOS	BV/TV	5.300	2.026	2.616	0.017	*
	Tb.N	8.691	2.308	3.766	0.001	***
	Tb.Sep	-42.686	6.592	-6.475	0.001	***
1-6	BV/TV	-0.424	2.642	-0.161	0.874	NS
	Tb.N	3.126	3.716	0.841	0.411	NS
	Tb.Sep	-4.516	4.331	-1.043	0.311	NS
1-7	BV/TV	-1.892	3.442	-0.550	0.589	NS
	Tb.N	-1.726	3.865	-0.447	0.660	NS
	Tb.Sep	-0.575	3.992	-0.144	0.887	NS
iNOS (10µg/µl) vs nNOS	BV/TV	1.537	2.913	0.528	0.604	NS
	Tb.N	3.718	3.203	1.161	0.261	NS
	Tb.Sep	0.085	4.220	0.020	0.984	NS
1-9	BV/TV	-1.828	1.997	-0.915	0.372	NS
	Tb.N	1.246	2.368	0.526	0.605	NS
	Tb.Sep	-0.131	4.177	-0.031	0.975	NS
iNOS (10µg/µl) vs Kontrol / Control	BV/TV	-1.190	3.146	-0.378	0.710	NS
	Tb.N	-0.258	2.799	-0.092	0.927	NS
	Tb.Sep	-2.309	3.748	1.343	0.196	NS
1-11	BV/TV	-2.250	4.330	-0.520	0.610	NS
	Tb.N	0.067	3.445	0.019	0.985	NS
	Tb.Sep	-2.780	5.523	-0.503	0.621	NS
2-4	BV/TV	-0.598	2.513	-0.238	0.815	NS
	Tb.N	-2.984	2.448	-1.219	0.238	NS
	Tb.Sep	1.701	3.295	0.463	0.562	NS
iNOS (30µg/µl) vs eNOS	BV/TV	9.068	1.898	4.777	0.001	***
	Tb.N	8.768	1.729	5.072	0.001	***
	Tb.Sep	-41.179	6.475	-6.360	0.001	***
2-6	BV/TV	3.344	2.545	1.314	0.205	NS
	Tb.N	3.203	3.387	0.946	0.357	NS
	Tb.Sep	-3.009	4.151	-0.725	0.478	NS
iNOS (30µg/µl) vs nNOS	BV/TV	1.876	3.368	0.557	0.584	NS
	Tb.N	-1.649	3.550	-0.465	0.648	NS
	Tb.Sep	0.932	3.796	0.246	0.809	NS
2-8	BV/TV	4.090	2.825	1.878	0.077	NS
	Tb.N	3.795	2.815	1.348	0.194	NS
	Tb.Sep	1.592	4.035	0.395	0.698	NS

Mekanik uyarana bir cevap olarak, eNOS periodontal dokudaki NO üretimi için gerekli olan esas izorformdur (11, 20, 41). İnvitro çalışmalarda benzer şekilde, gerilim kuvvetleri altında, periodontal hücre kültürlerinde, eNOS aktivasyonu sonucu NO üretilmektedir (14). Bu bulgular, bizim bulgularımıza benzerlik göstermektedir.

eNOS'un düzenli üretimi, osteoklastik fonksiyonun uyarılmasına neden olmaktadır

trabecular bone volume compared with controls and an increase of about 10% in cortical and trabecular thickness (18). Increased bone mass and decreased bone turnover, indicated that the nNOS isoform plays an important role in the regulation of bone mass and bone turnover in mice (18). eNOS and nNOS are the most effective NOS enzymes in bone (37-39), but in Van't Hof et al.'s (18) study, nNOS would be possible



NOS İnhibitörlerinin Diş Hareketi Üzerine Etkileri
Nitric Oxide And Tooth Movement



		BV/TV	1.940	1.867	1.039	0.313	NS
	2-9	Tb.N	1.323	1.808	0.732	0.474	NS
		Tb.Sep	1.376	3.990	0.345	0.734	NS
		BV/TV	2.578	3.065	0.841	0.411	NS
iNOS (30µg/µl) vs Kontrol/ Control	2-10	Tb.N	-0.181	2.344	-0.077	0.939	NS
		Tb.Sep	-0.802	2.614	1.644	0.118	NS
		BV/TV	1.518	4.272	0.355	0.726	NS
	2-11	Tb.N	0.144	3.087	0.047	0.963	NS
		Tb.Sep	-1.273	5.383	-0.236	0.816	NS
		BV/TV	-2.585	3.131	-0.826	0.420	NS
	3-4	Tb.N	-5.199	3.543	-1.468	0.159	NS
		Tb.Sep	4.856	4.795	0.685	0.432	NS
iNOS (100µg/µl) vs eNOS		BV/TV	7.081	2.662	2.660	0.016	*
	3-5	Tb.N	6.553	3.090	2.121	0.048	*
		Tb.Sep	-38.024	7.218	-5.268	0.001	***
		BV/TV	1.357	3.157	0.430	0.672	NS
	3-6	Tb.N	0.988	4.246	0.233	0.819	NS
		Tb.Sep	0.146	5.235	0.028	0.978	NS
		BV/TV	-0.111	3.851	-0.029	0.977	NS
	3-7	Tb.N	-3.864	4.377	-0.883	0.389	NS
		Tb.Sep	4.087	4.958	0.824	0.421	NS
iNOS (100µg/µl) vs nNOS		BV/TV	3.318	3.386	0.980	0.340	NS
	3-8	Tb.N	1.580	3.805	0.415	0.683	NS
		Tb.Sep	4.747	5.144	0.923	0.368	NS
		BV/TV	-0.047	2.641	-0.018	0.986	NS
	3-9	Tb.N	-0.892	3.135	-0.285	0.779	NS
		Tb.Sep	4.532	5.108	0.887	0.387	NS
		BV/TV	0.591	3.589	0.165	0.871	NS
iNOS (100µg/µl) vs Kontrol/ Control	3-10	Tb.N	-2.396	3.472	-0.690	0.499	NS
		Tb.Sep	2.353	2.457	0.918	0.071	NS
		BV/TV	-0.469	4.662	-0.101	0.921	NS
	3-11	Tb.N	-2.071	4.011	-0.516	0.612	NS
		Tb.Sep	1.882	6.257	0.301	0.767	NS

BV/TV: Trabeküler Kemik Hacmi, Tr.N: Trabeküler Kemik Sayısı, Tr.Sep: Trabeküler Ayrıklık, OF: Ortalama Fark, SH: Standart Hata. / BV/TV: Trabecular Bone Volume, Tr.N: Trabecular Bone Number, Tr.Sep: Trabecular Separation, MD: Mean difference, SE: Standard error, Sig: Significance.
* P < .05, *** P < .001, , NS: not significant.

Tablo IV devamı. Trabeküler Kemik Hacmi, Trabeküler Kemik Sayısı ve Trabeküler Ayrıklık parametrelerinin gruplar arası farklılıklarının (iNOS ile eNOS, nNOS ve Kontrol Grupları arasında) karşılaştırılması.

Table IV continue. Comparison of Between-Group Differences (between iNOS and eNOS, nNOS, Control Groups) for Trabecular Bone Volume, Trabecular Bone Number and Trabecular Separation.

(42). Buna karşın, bizim çalışmamızda eNOS inhibisyonu Tr.Sep artışı ile sonuçlanmıştır. Bu değerlendirme bizlere, eNOS'un sadece kemik rezorbsiyonunda değil, aynı zamanda kemik formasyonunda da önemli rol oynadığını göstermektedir. Ancak, eNOS inhibisyonuna bağlı BV/TV düşüşü, kemik formasyonunda daha aktif olduğunu ortaya koymaktadır. Aguirre ve ark. (11), eNOS un etkilerini eNOS inaktive edilmiş farelerde incelemiş ve % 45 kemik hacminde ve % 52 kemik formasyonunda azalma ile sonuçlanan osteoblast maturasyonu ve aktivitesinde defektler tespit etmişlerdir. Grup 5'te (eNOS 30µg), kontrol gruplarına (Grup 10 ve 11)

more active in bone turnover owing to inactivation of the nNOS gene. An appropriate future study would be useful to determine which of the two isoforms is more active in orthodontic tooth movement using eNOS and nNOS KO animals.

The outcomes of the TAS analysis revealed statistically significant alterations in BV/TV, Tr.N and Tr.Sep for the eNOS groups, especially Group 5 (30µg) compared to the other groups. Decreases in BV/TV and Tr.N and, increase in Tr.Sep in Group 5 were significant both in the comparison of intragroup differences and between-group differences. These data indicate that eNOS





Tablo V. Trabeküler Kemik Hacmi, Trabeküler Kemik Sayısı ve Trabeküler Ayrıklık parametrelerinin gruplar arası farklılıklarının (eNOS ile nNOS ve Kontrol Grupları arasında) karşılaştırılması.

Table V. Comparison of Between-Group Differences (between eNOS and nNOS, Control Groups) for Trabecular Bone Volume, Trabecular Bone Number and Trabecular Separation.

Gruplar / Groups	Parametreler/ Parameters	OF / MD	SH / SE	Z	p	Anlamlılık/ Sig
eNOS (10µg/µl) vs nNOS	BV/TV	2.473	3.720	0.665	0.515	NS
	4-7 Tb.N	1.335	3.812	0.350	0.730	NS
	Tb.Sep	-0.769	1.534	-0.462	0.732	NS
	4-8 BV/TV	3.688	3.237	1.823	0.085	NS
	Tb.N	6.085	3.043	1.723	0.102	NS
	Tb.Sep	-0.109	1.925	-0.254	0.687	NS
eNOS (10µg/µl) vs Kontrol / Control	BV/TV	2.538	2.447	1.037	0.313	NS
	4-9 Tb.N	4.307	2.280	1.889	0.075	NS
	Tb.Sep	-0.325	1.427	-0.518	0.823	NS
	BV/TV	3.176	3.449	0.921	0.369	NS
	4-10 TbN	2.803	2.725	1.029	0.317	NS
	TbSp	-2.503	3.528	-1.319	0.204	NS
eNOS (30µg/µl) vs nNOS	BV/TV	2.116	4.555	0.464	0.648	NS
	4-11 TbN	3.128	3.386	0.924	0.368	NS
	TbSp	-2.974	4.742	-0.456	0.712	NS
	BV/TV	-7.192	3.336	-2.156	0.045	*
	5-7 Tb.N	-10.417	3.395	-3.068	0.007	**
	Tb.Sep	42.111	5.670	7.427	0.001	***
eNOS (30µg/µl) vs Kontrol / Control	BV/TV	-4.978	3.542	-1.350	0.046	*
	5-8 Tb.N	-5.634	3.652	-1.086	0.039	*
	Tb.Sep	42.771	5.833	7.333	0.001	***
	BV/TV	-7.128	1.809	-3.940	0.001	***
	5-9 Tb.N	-7.445	1.482	-5.024	0.001	***
	Tb.Sep	42.555	5.802	7.335	0.001	***
eNOS (30µg/µl) vs Kontrol / Control	BV/TV	-6.490	3.030	-2.142	0.046	*
	5-10 TbN	-8.949	2.103	-4.255	0.001	***
	TbSp	40.377	6.018	6.182	0.001	***
	BV/TV	-7.550	4.247	-1.778	0.047	*
	5-11 TbN	-8.624	2.909	-2.965	0.008	**
	TbSp	39.906	6.835	5.838	0.001	***
eNOS (100µg/µl) vs nNOS	BV/TV	-1.468	3.742	-0.392	0.699	NS
	6-7 Tb.N	-4.852	4.474	-1.085	0.292	NS
	Tb.Sep	3.941	2.729	1.444	0.166	NS
	BV/TV	1.961	3.262	0.601	0.555	NS
	6-8 Tb.N	0.592	3.916	0.151	0.882	NS
	Tb.Sep	4.601	3.053	1.507	0.149	NS
eNOS (100µg/µl) vs Kontrol / Control	BV/TV	-1.404	2.480	-0.566	0.578	NS
	6-9 Tb.N	-1.880	3.268	-0.575	0.572	NS
	Tb.Sep	4.385	2.993	1.465	0.160	NS
	BV/TV	-0.765	3.472	-0.220	0.828	NS
	6-10 Tb.N	-3.384	3.593	-0.942	0.359	NS
	Tb.Sep	2.207	3.137	0.673	0.436	NS
eNOS (100µg/µl) vs Kontrol / Control	BV/TV	-1.826	4.573	-0.399	0.694	NS
	6-11 Tb.N	-3.059	4.116	-0.743	0.467	NS
	Tb.Sep	1.736	4.692	0.370	0.716	NS

BV/TV: Trabeküler Kemik Hacmi, Tr.N: Trabeküler Kemik Sayısı, Tr.Sep: Trabeküler Ayrıklık, OF: Ortalama Fark, SH: Standart Hata. / BV/TV: Trabecular Bone Volume, Tr.N: Trabecular Bone Number, Tr.Sep: Trabecular Separation, MD: Mean difference, SE: Standard error, Sig: Significance. * P < .05, ** P < .01, *** P < .001, NS: not significant.



Gruplar / Groups	Parametreler/ Parameters	OF / MD	SH / SE	Z	p	Anlamlılık/ Sig
nNOS (10µg/µl) vs Kontrol/ Control	7-10 BV/TV	0.703	4.114	0.171	0.866	NS
	Tb.N	1.468	3.747	0.392	0.700	NS
	Tb.Sep	-1.734	2.662	1.779	0.092	NS
	7-11 BV/TV	-0.358	5.077	-0.070	0.945	NS
nNOS (30µg/µl) vs Kontrol / Control	TbN	1.793	4.251	0.422	0.678	NS
	TbSp	-2.205	4.382	-0.503	0.621	NS
	8-10 BV/TV	-2.726	3.683	-0.740	0.469	NS
	Tb.N	-3.977	3.059	-1.300	0.210	NS
nNOS (100µg/µl) vs Kontrol / Control	Tb.Sep	-2.394	2.859	1.571	0.134	NS
	8-11 BV/TV	-3.787	4.734	-0.800	0.434	NS
	TbN	-3.651	3.660	-0.998	0.332	NS
	TbSo	-2.865	4.590	-0.624	0.540	NS
nNOS (100µg/µl) vs Kontrol / Control	9-10 BV/TV	0.638	3.011	0.212	0.835	NS
	Tb.N	-1.505	2.169	-0.694	0.497	NS
	Tb.Sep	-0.471	1.822	1.628	0.121	NS
	9-11 BV/TV	-0.422	4.233	-0.100	0.922	NS
nNOS (100µg/µl) vs Kontrol / Control	TbN	-1.179	2.956	-0.399	0.695	NS
	TbSep	-2.649	4.551	-0.582	0.568	NS

BV/TV: Trabeküler Kemik Hacmi, Tr.N: Trabeküler Kemik Sayısı, Tr.Sep: Trabeküler Ayırıklık, OF: Ortalama Fark, SH: Standart Hata. / BV/TV: Trabecular Bone Volume, Tr.N: Trabecular Bone Number, Tr.Sep: Trabecular Separation, MD: Mean difference, SE: Standard error, Sig: Significance NS: not significant.

Tablo VI. Trabeküler Kemik Hacmi, Trabeküler Kemik Sayısı ve Trabeküler Ayırıklık parametrelerinin gruplar arası farklılıklarının (nNOS ile Kontrol Grupları arasında) karşılaştırılması.

Table VI. Comparison of Between-Group Differences (between nNOS and Control Groups) for Trabecular Bone Volume, Trabecular Bone Number and Trabecular Separation.

kıyasla, BV/TV ve Tr.N düşüşü ve Tr.Sep artışı sırasıyla 39.67 %, 45.46 % ve 59.70 % oranlarında gerçekleşmiştir.

eNOS inhibitörü uygulanmış grupları incelediğimizde, Grup 5 ile Grup 4 ve 6 karşılaştırıldığında, anlamlı Tr.Sep artışına karşın, BV/TV ve Tr.N anlamlı oranda düşüş göstermişlerdir. Buna ek olarak, Grup 4 ve 6'da, kontrol grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunmamıştır. Bu iki bulgu bizlere, eNOS yoluyla NO sentezinin doza bağımlı olmadığını göstermektedir. Buna karşın, uygun doz belirli bir aralıkta olup, düşük veya yüksek dozlar etki etmemektedir. Dolayısıyla, eNOS inhibisyonunun artışı için, doz artışı gereksiz görülmektedir. Bu bulgular, eNOS inhibisyonu ya da aktivasyonu için gerekli olan uygun doz aralığının tespiti için daha kapsamlı ve daha küçük doz aralıkları ile çalışmaların yapılması gerektiğini göstermektedir.

SONUÇ

eNOS grupları diğerleriyle karşılaştırıldığında BV/TV ve Tr.N düşüşüne bağlı olarak, bizim bulgularımız eNOS'un, ortodontik diş

could have an important role in bone metabolism and its effect could be primarily through an increase in bone formation. Observing this effect during experimental tooth movement made us conclude that in orthodontic tooth movement eNOS could be the primary NOS enzyme.

Under physiological conditions eNOS provides NO activation and regulates bone formation (20, 39, 40). In response to mechanical stimulus, eNOS is the major isoform that is needed for NO production in periodontal tissue (11, 20, 41). Similarly in in-vitro studies it was concluded that, under tension forces, cultured periodontal cells produce NO via eNOS activation (14). These findings are in accordance with our study.

Constant synthesis of eNOS leads to stimulation of osteoclastic function (42). In contrast to this, in our study eNOS inhibition resulted in an increase in Tr.Sep. This assessment indicates that eNOS plays an important role not only in bone resorption but also in bone formation. However, decrease in BV/TV due to eNOS inhibition indicates that it is more active in bone





hareketi sırasında kemik şekillenmesinde rol oynayan birincil izoenzim olabileceğini göstermektedir. Çalışmamızda elde edilen sonuçlara göre, eNOS yoluyla NO sentezinin doza bağımlı olmadığı optimum doz aralığının $30\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 'a yakın olduğu, yüksek ve düşük dozların etkisinin olmadığı sonuçlarına varılmıştır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Gülhane Askeri Tıp Akademisi tarafından desteklenmiş ve çalışmanın histomorfometrik incelemesi Çukurova Üniversitesi laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışma, 82. Avrupa Ortodonti Kongresinde poster tebliği olarak sunulmuştur.

formation. Aguirre et al. (11) demonstrated the effect of eNOS in eNOS gene inactivated mice, and they revealed that there are defects in osteoblast maturation and activity, which results in 45% decrease in bone volume, and 52% decrease in bone formation. These findings very well match our results. In Group 5 (eNOS $30\mu\text{g}$), the decreases in BV/TV and Tr.N, and increase in Tr.Sep were approximately 39.67%, 45.46% and 59.70% according to the control groups (Group 10 and 11) respectively.

When we evaluated eNOS inhibitor applied groups, BV/TV and Tr.N were decreased significantly in Group 5 compared to Group 4 and 6, whereas Tr.Sep is increased also significantly. In addition, in Group 4 and 6, there were not statistical significant differences compared to control groups. These two findings suggest that NO synthesis through eNOS is not dose-dependent. In contrast, optimum dose is in a certain range, and lower or higher doses do not have any effect. Therefore, to increase the inhibition of eNOS, dose increase is not reasonable. These data reveal the need for a broader study with narrower dose intervals to determine the optimum dose that assesses only eNOS inhibition or activation.

CONCLUSION

Due to the decrease of BV/TV and Tr.N in eNOS groups compared to others, our data suggest that eNOS could be the primary isoenzyme involved in bone remodeling during orthodontic tooth movement. According to the current study's result we concluded that NO synthesis through eNOS could not have a dose-dependent effect, optimum dose is close by $30\mu\text{g}/\mu\text{l}$, and lower or higher doses do not have any effect.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by Gülhane Military Medical Academy and the histomorphometric evaluation of the research was conducted at Çukurova University Laboratories.

This study was presented as poster presentation on the 82nd Congress of the European Orthodontic Society.



KAYNAKLAR/REFERENCES

1. Riancho JA, Mundy GR. The role of cytokines and growth factors as mediators of the effects of systemic hormones at the bone local level. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 1995;5:193-217.
2. Collin-Osdoby P, Nickols GA, Osdoby P. Bone cell function, regulation, and communication: a role for nitric oxide. *J Cell Biochem.* 1995;57:399-408.
3. Collin-Osdoby P, Osdoby P. The role of nitric oxide in regulating bone remodeling, Biological mechanisms of tooth movement and craniofacial adaptation. Birmingham: EBSCO Media; 1996. p.69-82
4. Danziger RS, Zuckerbraun BS, Pensler JM. Role of nitric oxide in the regulation of osteoblast metabolism. *Plast Reconstr Surg.* 1997;100:670-3.
5. Evans DM, Ralston SH. Nitric oxide and bone. *J Bone Miner Res.* 1996;11:300-5.
6. Hall TJ, Chambers TJ. Molecular aspects of osteoclast function. *Inflamm Res.* 1996;45:1-9.
7. Clancy RM, Amin AR, Abramson SB. The role of nitric oxide in inflammation and immunity. *Arthritis Rheum.* 1998;41:1141-51.
8. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:323-50.
9. Zamora R, Vodovotz Y, Billiar TR. Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. *Mol Med.* 2000;6:347-73.
10. Chae HJ, Park RK, Chung HT, Kang JS, Kim MS, Choi DY, et al. Nitric oxide is a regulator of bone remodelling. *J Pharm Pharmacol.* 1997;49:897-902.
11. Aguirre J, BATTERY L, O'Shaughnessy M, Afzal F, Fernandez de Marticorena I, Hukkanen M, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene-deficient mice demonstrate marked retardation in postnatal bone formation, reduced bone volume, and defects in osteoblast maturation and activity. *Am J Pathol.* 2001;158:247-57.
12. Fox SW, Chambers TJ, Chow JW. Nitric oxide is an early mediator of the increase in bone formation by mechanical stimulation. *Am J Physiol.* 1996;270(6 Pt 1):E955-60.
13. Hukkanen M, Hughes FJ, BATTERY LD, Gross SS, Evans TJ, Seddon S, et al. Cytokine-stimulated expression of inducible nitric oxide synthase by mouse, rat, and human osteoblast-like cells and its functional role in osteoblast metabolic activity. *Endocrinology.* 1995;136(12):5445-53.
14. Kikuri T, Hasegawa T, Yoshimura Y, Shirakawa T, Oguchi H. Cyclic tension force activates nitric oxide production in cultured human periodontal ligament cells. *J Periodontol.* 2000;71:533-9.
15. Ralston SH, Todd D, Helfrich M, Benjamin N, Grabowski PS. Human osteoblast-like cells produce nitric oxide and express inducible nitric oxide synthase. *Endocrinology.* 1994;135:330-6.
16. Riancho JA, Zarrabeitia MT, Fernandez-Luna JL, Gonzalez-Macias J. Mechanisms controlling nitric oxide synthesis in osteoblasts. *Mol Cell Endocrinol.* 1995;107:87-92.
17. van Bezooijen RL, Van der Bent C, Papapoulos SE, Lowik CW. Oestrogenic compounds modulate cytokine-induced nitric oxide production in mouse osteoblast-like cells. *J Pharm Pharmacol.* 1999;51:1409-14.
18. Van't Hof RJ, Macphee J, Libouban H, Helfrich MH, Ralston SH. Regulation of bone mass and bone turnover by neuronal nitric oxide synthase. *Endocrinology.* 2004;145:5068-74.
19. Watanuki M, Sakai A, Sakata T, Tsurukami H, Miwa M, Uchida Y, et al. Role of inducible nitric oxide synthase in skeletal adaptation to acute increases in mechanical loading. *J Bone Miner Res.* 2002;17:1015-25.
20. Zaman G, Pitsillides AA, Rawlinson SC, Suswillo RF, Mosley JR, Cheng MZ, et al. Mechanical strain stimulates nitric oxide production by rapid activation of endothelial nitric oxide synthase in osteocytes. *J Bone Miner Res.* 1999;14:1123-31.
21. Klein-Nulend J, Semeins CM, Ajubi NE, Nijweide PJ, Burger EH. Pulsating fluid flow increases nitric oxide (NO) synthesis by osteocytes but not periosteal fibroblasts--correlation with prostaglandin upregulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;217:640-8.
22. Pitsillides AA, Rawlinson SC, Suswillo RF, Bourrin S, Zaman G, Lanyon LE. Mechanical strain-induced NO production by bone cells: a possible role in adaptive bone (re)modeling? *Faseb J.* 1995;9:1614-22.
23. Collin-Osdoby P, Rothe L, Bekker S, Anderson F, Osdoby P. Decreased nitric oxide levels stimulate osteoclastogenesis and bone resorption both in vitro and in vivo on the chick chorioallantoic membrane in association with neoangiogenesis. *J Bone Miner Res.* 2000;15:474-88.
24. Tsukahara H, Miura M, Tsuchida S, Hata I, Hata K, Yamamoto K, et al. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on bone metabolism in growing rats. *Am J Physiol.* 1996;270(5 Pt 1):E840-5.
25. Akin E, Gurton AU, Olmez H. Effects of nitric oxide in orthodontic tooth movement in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2004;126:608-14.
26. Hayashi K, Igarashi K, Miyoshi K, Shinoda H, Mitani H. Involvement of nitric oxide in orthodontic tooth movement in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2002;122:306-9.
27. Shirazi M, Nilforoushan D, Alghasi H, Dehpour AR. The role of nitric oxide in orthodontic tooth movement in rats. *Angle Orthod.* 2002;7:211-5.
28. Donath K. Preparation of Histologic Sections. Norderstedt, Germany: EXAKT-Kulzer; 1995.
29. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, et al. Bone





- histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res.* 1987;2:595-610.
30. Zar JH. *Biostatistical analysis.* Upper Saddle River: Prentice Hall Inc; 1996.
 31. Haruyama N, Igarashi K, Saeki S, Otsuka-Isoya M, Shinoda H, Mitani H. Estrous-cycle-dependent variation in orthodontic tooth movement. *J Dent Res.* 2002;81:406-10.
 32. Kvinnsland S, Heyeraas K, Ofjord ES. Effect of experimental tooth movement on periodontal and pulpal blood flow. *Eur J Orthod.* 1989;11:200-5.
 33. Otero RL, Parodi RJ, Ubios AM, Carranza FA, Jr., Cabrini RL. Histologic and histometric study of bone resorption after tooth movement in rats. *J Periodontal Res.* 1973;8:327-33.
 34. Rygh P, Bowling K, Hovlandsdal L, Williams S. Activation of the vascular system: a main mediator of periodontal fiber remodeling in orthodontic tooth movement. *Am J Orthod.* 1986;89:453-68.
 35. Yamasaki K. The role of cyclic AMP, calcium, and prostaglandins in the induction of osteoclastic bone resorption associated with experimental tooth movement. *J Dent Res.* 1983;62:877-81.
 36. Yamasaki K, Shibasaki Y, Fukuhara T. Behavior of mast cells in periodontal ligament associated with experimental tooth movement in rats. *J Dent Res.* 1982;61:1447-50.
 37. Helfrich MH, Evans DE, Grabowski PS, Pollock JS, Ohshima H, Ralston SH. Expression of nitric oxide synthase isoforms in bone and bone cell cultures. *J Bone Miner Res.* 1997;12:1108-15.
 38. Kasten TP, Collin-Osdoby P, Patel N, Osdoby P, Krukowski M, Misko TP, et al. Potentiation of osteoclast bone-resorption activity by inhibition of nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:3569-73.
 39. Riancho JA, Salas E, Zarrabeitia MT, Olmos JM, Amado JA, Fernandez-Luna JL, et al. Expression and functional role of nitric oxide synthase in osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res.* 1995;10:439-46.
 40. Turner CH, Takano Y, Owan I, Murrell GA. Nitric oxide inhibitor L-NAME suppresses mechanically induced bone formation in rats. *Am J Physiol.* 1996;270(4 Pt 1):E634-9.
 41. Klein-Nulend J, Helfrich MH, Sterck JG, MacPherson H, Joldersma M, Ralston SH, et al. Nitric oxide response to shear stress by human bone cell cultures is endothelial nitric oxide synthase dependent. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;250:108-14.
 42. Brandi ML, Hukkanen M, Umeda T, Moradi-Bidhendi N, Bianchi S, Gross SS, et al. Bidirectional regulation of osteoclast function by nitric oxide synthase isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:2954-8.
 43. Mermut S, Bengi AO, Akin E, Kurkcu M, Karacay S. Effects of Interferon-Gamma on Bone Remodeling during Experimental Tooth Movement. *Angle Orthod.* 2007; 77:135-41.
 44. Gokce S, Bengi AO, Akin E, Karacay S, Sagdic D, Kurkcu M, et al. Effects of hyperbaric oxygen during experimental tooth movement. *Angle Orthod.* 2008;78:304-8.
 45. Yamaguchi M, Hayashi M, Fujita S, Yoshida T, Utsunomiya T, Yamamoto H, Kasai K. Low-energy laser irradiation facilitates the velocity of tooth movement and the expressions of matrix metalloproteinase-9, cathepsin K, and alpha(v) beta(3) integrin in rats. *Eur J Orthod.* 2010;32:131-139.