

Düşük frekanslı elektromanyetik alanın tükürük bezleri üzerindeki zararlı etkileri

The effect of negative effects of extremely low-frequency electromagnetic fields on salivary glands

Mehmet Sinan DOĞAN¹, Abdulsamet TANIK², Mehmet Cihan YAVAŞ³

¹ Harran Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Çocuk Diş Hekimliği Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye

² Adıyaman Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Periodontoloji Anabilim Dalı, Adıyaman, Türkiye

³ Ahi Evran Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Kırşehir, Türkiye

Öz.

Amaç: Bu çalışmada düşük frekanslı EMA'nin tükürük bezleri üzerinde herhangi bir zararlı etkisini ve Melatonin (MLT) ve Ganoderma lucidum(GL)'un bu zararlı etkilere karşı koruyucu bir etkisinin olup olmadığını histopatolojik ve immunohistokimyasal olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve metod: Bu çalışmada toplamda 56 adet Wistar Albino sıçan kullanıldı. Sıçanlar 7 eşit gruba ayrıldı ve sıçanlar her gün 8 saat yüksek gerilimden üretilen elektromanyetik alana (EMA) maruz bırakıldı. Grup 1 ve 4'e sadece EMA, grup 2 ve 5'e EMA + GL (20 mg / kg / gün), grup 3 ve 6'ya EMA +MLT(10 mg / kg / gün) ve grup 7 kontrol grubu olarak kullanıldı. Sıçanlara, GL oral gavaj yoluyla ve MLT intraperitoneal yolla uygulandı. Grupların yarısı 26. günde ve kalan diğer gruplar da 52. günde sakrifiye edilmiştir. Elde edilen numunelerin histopatolojik ve immünohistokimyasal analizleri yapılmıştır.

Bulgular: Yapılan histopatolojik analiz sonucunda; 26. ve 52. günde sıçanlar gruplar arası karşılaştırılmasında EMA, (EMA+MLT) ve (EMA + GL) uygulanan gruplarda intra ve interlobuler kanallarda dejenerasyon, iltihabi hücre infiltrasyonu ve kan damarlarında dilatasyon ve hemorajik kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede fark bulunmuştur (p<0.05). immünohistokimyasal analizlerde ise, Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF) ve E-kadherin yapışma reseptörü(E-kadherin) ekspresyonu kontrol grubu hariç diğer gruplarda pozitif ekspresyonu gözlemlenmiştir.

Sonuç: EMA'ye maruziyetin sıçanların tükürük bezlerinde histopatolojik değişikliklere neden olduğu gözlemlenmiştir. Yapılan tedavilerde MLT ve GL'nin kullanımı bu zararlı etkilere karşı koruyucu bir etkiye sahip olabilir.

Anahtar kelimeler: Elektromagnetik Alan, Melatonin, Ganoderma lucidum, Tükürük bezleri

Abstract

Background: In this study, using histopathological and immunohistochemical methods, we aimed to investigate whether Low-Frequency EMA has any harmful effects on salivary glands and whether Melatonin (MLT) and Ganoderma lucidum (GL) have protective effects against these harmful effects

Material and methods: A total of 56 Wistar albino rats were used in this study. The rats were divided into 7 equal groups and exposed to the EMA produced from high voltage 8 hours of each day. EMA + MLT (10 mg / kg / day) for groups 3 and 6, just EMA for groups 1 and 4, EMA + GL (20 mg / kg / day) for groups 2 and 5 were used. Group 7 was determined as a control group. Rats were administered GL via oral gavage and MLT via the intraperitoneal route. Half of the groups were sacrificed on day 26 and the rest of the groups were sacrificed on day 52. Histopathological and immunohistochemical analyses of the obtained specimens were performed.

Results: As a result of the histopathological analysis, some parameters such as intra and interlobular duct degeneration, inflammatory cell infiltration and blood vessel dilatation and haemorrhage were found statistically significant difference in the groups treated with EMA, (EMA+MLT) and (EMA + GL) compared to the control group on the 26th and 52nd at day (p<0.05). In immunohistochemical analyses, the positive expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and E-cadherin adhesion receptor (E-cadherin) was observed in all groups except for control group.

Conclusion: Exposure to EMA caused histopathological changes in the salivary glands of the rats. The use of MLT and GL in treatment may be protective against these harmful effects.

Keywords: Electromagnetic Field, Melatonin, Ganoderma lucidum, Salivary glands

Sorumlu Yazar / Corresponding Author

Dr. Mehmet Sinan DOĞAN

Harran Üniversitesi, Diş Hekimliği
Fakültesi, Çocuk Diş Hekimliği
Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye

Tel: 0534 241 24 61

E-mail: dtlider@hotmail.com

Geliş tarihi / Received: 21.07.2018

Kabul tarihi / Accepted: 30.07.2018

Giriş

Dünyada teknolojinin gelişmesiyle birçok alanda elektronik aygıtlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Gelişen teknolojilere bağlı olarak elektrik ve elektronik cihazların yaygınlaşmasıyla, bu cihazların oluşturduğu düşük frekanslı EMA maruziyetinin artmasıyla insan sağlığını olumsuz etkileyen çeşitli biyolojik etkiler ve potansiyel tehlikelerin oluşması endişesi de artmaktadır (1,2).

Çeşitli invitro ve invivo çalışmalarda EMA'ya maruz kalması, sinir sistemini, vücut ağırlığını, doku morfolojisini ve histolojisini, dolaşım sistemini, hormonal sistemini ve bağışıklık sistemi etkilediğini göstermiştir (3).

Yapılan farklı deney hayvanı çalışmalarında EMA'ya maruz kalması, makrofajlarda artmış fagositik aktivite, beyin dokusu elektrolit seviyeleri, embriyonik gelişimi etkileyebileceği, enzim ve hücresel değişiklikler gösterilmiştir (4-6).

Bazı çalışmalarda EMA'ya uzun süreli bir aralıkta maruz kalması; hücre bölünmesinde ve dokularda yapısal değişiklikler, kanser oluşumunu ve protein (DNA ve RNA) sentezinde bozulmalara yol açabileceği bildirilmiştir (6,7).

MLT(N-acetyl-5-methoxytryptamine), önemli bir antioksidan olan çoğunlukla pineal bezden ve diğer ekstra-pineal organlardan kana salınan endojen bir hormondur (8). MLT'nin çeşitli fizyolojik fonksiyonları düzenleyen etkiye sahiptir. MLT hücrelerin membranları üzerindeki çeşitli resöptörler aracılığıyla etkisini gösterir(9). MLT, Antioksidan enzimlerin salınmasını uyarır ve vücutta oluşan serbest radikalleri serbest bırakır ve MLT'nin doğrudan veya dolaylı antioksidatif etkisi vücutta ve oral kavitedeki güçlü oksidatif hasara karşı direnç gösterir (10). MLT, immün artırıcı, anti-inflamatuar özelliklere sahip olduğu ve kanser progresyonunu inhibe ettiği kabul edilmektedir (11). EMA'lere maruz kalma, melatonin konsantrasyonunun azalmasına neden olmaktadır (12). Buna ek olarak, GL yüzyıllar boyunca Doğu Asya'da çeşitli hastalıkları tedavi etmek için kullanılmış ve çeşitli farmakolojik etkileri olduğu bilinen geleneksel bir Çin tıbbi mantarıdır. Çoğu mantarın ağırlığın %90'ı su içerir. GL için de bu böyledir, kalan % 10'unu karbonhidrat, yağ, fiber ve proteinden oluşmaktadır. Ek olarak GL; terpenoidler, steroidler fenoller, glikoproteinler ve polisakkaritler gibi çok çeşitli biyoaktif bileşenleri içerir. (13-15). GL olarak bilinen mantar türü, immünojenik bozukluklar, inflamasyon, serbest radikal üretiminin önlenmesi, hipertansiyon, diyabet ve kanser tedavisi için etkilidir (16,17).

Tükürük ekzokrin bezler tarafından üretilen, sindirim kolaylaştırıcı ve birçok fonksiyonel immün maddeyi içeren ağız-diş sağlığı ve bütün organizma için önemli bir sıvıdır. Tükürük bezleri sürekli fonksiyon gösteren organlardır. Erişkinde günde 1000-1500 ml. tükürük salgılanır (18).

Çeşitli immunolojik, metabolik ve elektromanyetik alan etkileri sonucunda tükürük bezlerinin gerek parenkiminde gerekse de salgı yapısında değişiklikler ortaya çıkabilir. Baş boyun kanserlerinde uygulanan radyoterapiye bağlı

olarak, tükürük bezlerinde asiner ve duktal sistemde değişiklikler olur (19).

Tükürüğün oral dokuları yıkayıcı özelliği olması; mikrobiyal dental plak, diş çürüğü, diştaşı oluşumunu ve bazı mikroorganizmaların proliferasyonu önlemekte ve periodontal sağlığının devamını sağlar. Ayrıca son yıllarda yapılan çalışmalarda tükürüğün içinde bulunan bazı biyo belirteçlerin ağız kanserleri, hepatit C, HIV ve periodontal hastalıkların teşhisinde kullanıldığı bildirilmiştir (20,21).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar elektromanyetik alan uygulamasının ağız dokulardan alveol kemiği, periodontal ligamentler ve dişler üzerindeki etkileri göstermiştir(22-24); ama EMA'nin tükürük bezi ve içindeki bileşenleri üzerindeki etkisini konu alan çok nadir çalışma bulunmaktadır. Buradan hareketle, çalışmamızda düşük frekanslı EMA'nin tükürük bezi üzerinde herhangi bir zararlı etkisinin olup olmadığı ve MLT ve GL'nin bu zararlı etkilere karşı koruyucu bir etkisinin olup olmadığını histopatolojik ve immünohistokimyasal olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod

Dicle Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulundan (DÜHADEK) etik kurul onayı alınmıştır. Deney hayvanlarında yapılan operasyonlar, Dicle Üniversitesi Prof. Dr. Sabahattin Payzın Sağlık Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkezi (DÜSAM) ameliyathanesinde yapılmıştır. Bu çalışmada, ortalama ağırlıkları 250-300 gr olan 56 adet 4 aylık Wistar cinsi erkek Albino sıçan kullanılmıştır. Deney hayvanlarına 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık siklusu olacak şekilde yaşamları sağlanmıştır. Deneklere su ve yiyeceğe serbest erişim olanağı sağlanmış ve oda sıcaklığı 22±2°C'de sabit tutulmuştur. Buldukları odanın nem oranı %30-40 arasında olacak şekilde, odanın havalandırma sistemi filtre edilerek, kontaminasyon riski önlenmiştir. Sıçanların birbirine zarar vermemesi için ayrı kafeslerde ve altlarında talaş olacak şekilde yerleştirilmeleri sağlanmıştır.

Çalışmadaki Deney Hayvanların Gruplandırılması:

Çalışmamızda kullanılan sıçanlar, 26. gün ve 52. gün olmak üzere 2 farklı dönem için planlandı. Bu 2 dönem de kendi aralarında alt grup olmak üzere toplam 7 farklı gruba ayrıldı:

Grup 1: 8 adet sıçanda 26 gün boyunca EMA'ye maruz bırakıldı ve denekler 26. günde sakrifiye edildi.

Grup 2: 8 adet sıçanda 26 gün boyunca EMA'ye maruz bırakıldı ve GL uygulandı. Denekler 26. günde sakrifiye edildi.

Grup 3: 8 adet sıçanda 26 gün boyunca EMA'ye maruz bırakıldı ve MLT uygulandı. Denekler 26. günde sakrifiye edildi.

Grup 4: 8 adet sıçanda 52 gün boyunca EMA'ye maruz bırakıldı ve denekler 26. günde sakrifiye edildi.

Grup 5: 8 adet sıçanda 52 gün boyunca EMA'ye maruz bırakıldı ve GL uygulandı. Denekler 26. günde sakrifiye edildi.

Grup 6: 8 adet sıçanda 52 gün boyunca EMA'ye maruz bırakıldı ve MLT uygulandı. Denekler 26. günde sakrifiye edildi.

Grup 7: 8 adet sıçanda herhangi bir işlem uygulanmadı. Denekler kontrol grubu olarak kullanıldı

EMA'nın Oluşturulması: EMA oluşturmak için, üretilen iki transformatör 10 kV (10,000 V) yüksek voltaj kullanıldı. Transformatör 1 için, giriş 220 V ve çıkış 10 kV idi. Transformatör 2 için, giriş 10 kV idi ve çıkış 220 V ve 5,000 VA idi. Hem 26 günlük hem de 52 günlük deney gruplarındaki (Grup 1, 2, 3, 5 ve 6) sıçanlara, her gün 8 saat EMA'ye maruz bırakıldı. Plexiglas kafeste ortalama manyetik alan yoğunluğunu (2.48 µT) ve elektrik alan şiddetini (80.3 V / m) ölçtük. EMA, 6 dakikalık ölçüm yöntemini (Uluslararası İyonize Olmayan Radyasyon Koruması [ICNIRP]) kullanarak bir Spectran cihazı NF5035 (AARONIA AG, Strickscheid, Almanya) yardımıyla ölçüldü.

MLT ve GL, hayvanların ağırlığına ve uygun standartlara göre hazırlandı. İki MLT grubundaki her sıçanda, 10 mg / kg MLT (Merck KGaA, Darmstadt, Almanya) saf etanol içerisinde çözündürülmüş ve daha sonra damıtılmış su ile seyreltilmiş MLT, intraperitoneal olarak günlük olarak uygulandı. İki GL grubundaki her sıçan için, 20 mg/kg GL (Gano Excel Industries Sdn. Bhd., Kedah, Malezya) damıtılmış su ile seyreltilerek hazırlandı ve oral gavaj yoluyla uygulandı. Çalışmanın sonunda, sıçanların 45 mg/kg %10'luk Ketamin HCl(Ketasol®, Richter Pharma, Wels, Avusturya) ve 3 mg/kg %2'lik Xylazine HCl(Xylazinbio®, Bioveta, İntermed Ecza Deposu, Ankara, Türkiye) kullanılarak intramusküler enjeksiyon yöntemi ile anestezisi yapıldı. Daha sonra sıçanlar, intrakardiyak öldürücü enjeksiyon ile ötenazi yapıldı ve çenelerindeki majör tükürük bezleri kesilip alındı ve hemen tükürük bez örnekleri ortam sıcaklığında kapalı plastik kutularda % 10 formaldehit çözeltisi içine konuldu.

Histolojik Analiz: Alınan örnekler histoloji laboratuvarında doğrudan nötral tamponlanmış formalin çözeltisi içinde fikse edildi. Örneklerin tam fiksasyonu yapıldıktan sonra 12 saat kadar su altında yıkanmaları için bekletildi. Daha sonra dehidratasyon işlemi için dereceli artan alkol derişimde 12'şer saat süreyle bekletildi. Xylolde şeffaflaştırma işleminden sonra dokuların infiltrasyonu yapıldıktan hemen sonra parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan bir mikrotomla (Rotatory Microtome, Leica, RM 2265, Almanya) 5µm kalınlığında kesitler edildikten sonra, rutin boyama için Hematoksilin-Eozin(H&E) boya ile boyandı.

İmmunohistokimyasal analiz VEGF ve E-kadherin İmmün Boyama Yöntemi:

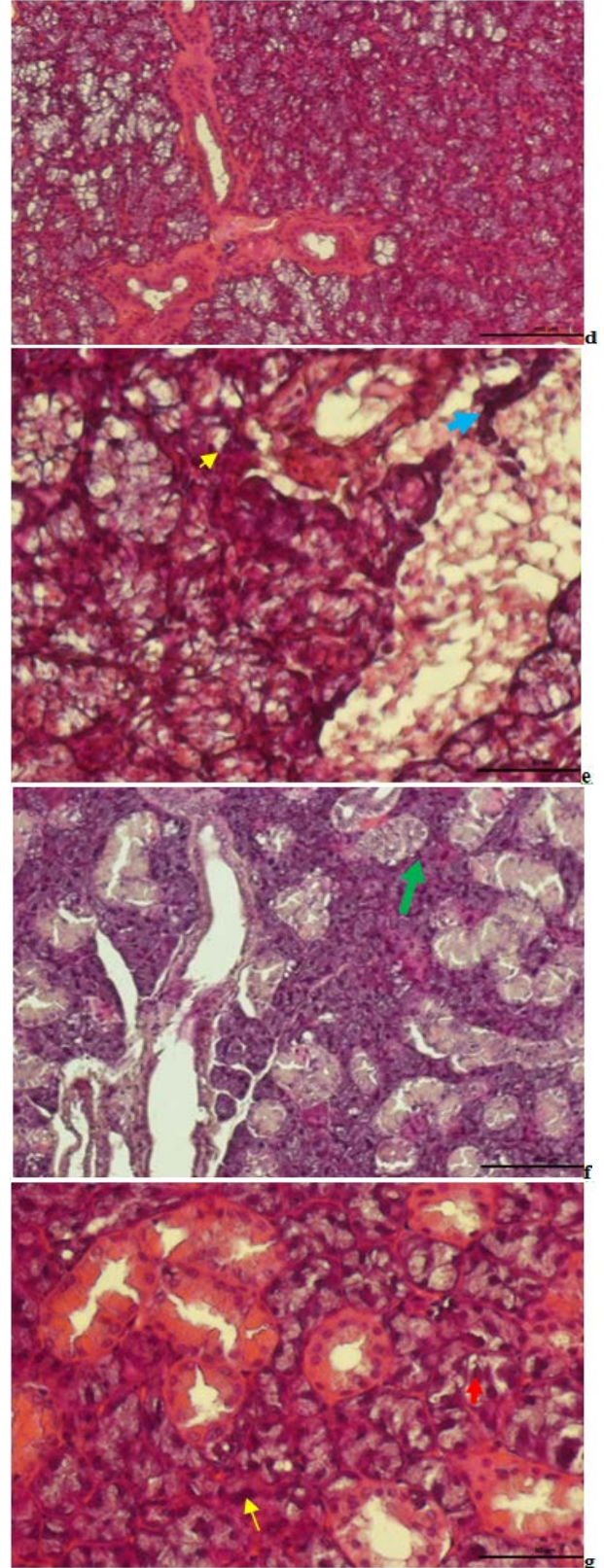
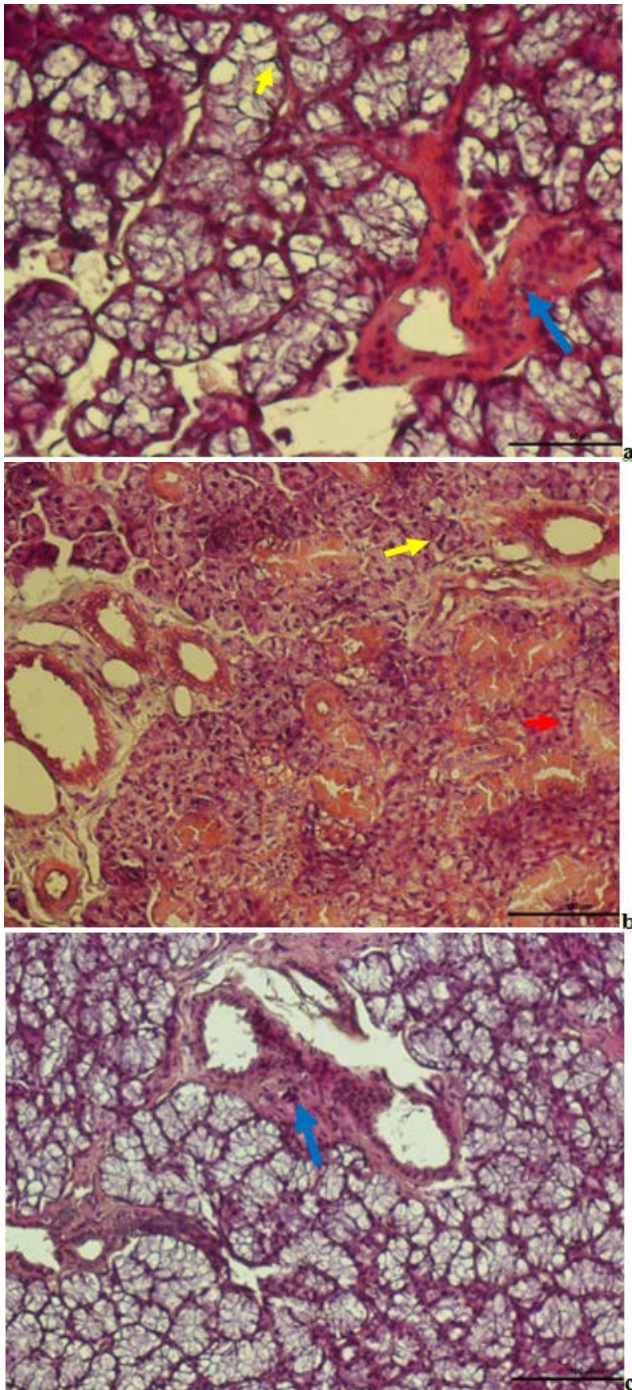
Parafin bloklardan alınan kesitler poli-L-lysin kaplı lamların üzerine alındı. Oda ısısında bekletildi. Bir gece 60 C° lik etüvde bekletildi. Kesitler soğuduktan sonra 2 defa 5 dakika ksilende tutuldu. Ardından etil alkolde 5'er dakika bekletildi. Alkol derişimlerden geçtikten sonra 5 dakika distile su içinde bekletildi. Lam üzerine alınan örneklerin etrafı dakopen kalem(Huiyou,Çin) ile sınırlandırıldı. 700 W'lık Mikrodalga fırında 7+5 dakika sitrik asit(pH:6.0) içerisinde bekletilip antijen maskelenmesi kaldırıldı. Daha sonra 20 dakika oda ısısında bekletilerek soğuma işlemi gerçekleştirildi. PBS(Fosfat Tamponlu Tuz) çözeltisi ile 3X5 dakika yıkandı. Endojen peroksit blokajı sağlamak için %3'lük hidrojen peroksit(H₂O₂) içinde 20 dakika tutuldu. Kesitler tekrar 3x5 dakika PBS içinde tutuldu ve inkubasyon kabı içine alındı. Daha sonra yapılan tüm işlemler bu inkubasyon kabı içinde gerçekleştirildi. Alınan kesitler üzerine Blok solüsyonu (Histostain-Plus Kit, Invitrogen, Carlsbad, Amerika) damlatılarak 1 saat kadar bekletildi ve hemen sonra kesitlere VEGF, (fare monoclonal, 1/100, Santa Cruz, Kaliforniya, Amerika), ve E-kadherin (fare monoclonal, 1/200, Santa Cruz, Kaliforniya, Amerika), antikorları uygulandı. Primer antikor damlatılarak 1 saat süreyle bekletildi. PBS solüsyonu ile 3X5 dakika yıkandı. Primer antikor ile uyumlu biyotinenmiş sekonder antikor(Histostain-Plus Kit, Invitrogen, Carlsbad, Amerika) damlatıldıktan sonra, oda ısısında kapalı nemli kutuda 30 dakika bekletildi. PBS solüsyonu ile 3X5 dakika yıkandıktan hemen sonra, hazırlanan streptavidinle işaretli sekonder antikor(Zymed, Histostain-Plus Kit, Kaliforniya, Amerika) damlatılıp, oda ısısında kapalı nemli kutuda 30 dakika bekletildi. PBS solüsyonu ile 3X5 dakika yıkandı. Kromojen olarak AEC(Aminoetil Karbazol) solüsyonu (AEC, Invitrogen, Carlsbad, Amerika) damlatıldı. Distile su ile yıkanarak antijen-antikor reaksiyonunun engellenmesi sağlandı. Mayer hematoksileni ile zıt boyama yapıldı. Tekrar distile su ile yıkanarak lamel ile kapatıldı. Son aşamada kör değerlendirme için kesitler fotomikroskopla (Nikon Eclipse i50, Japonya) immünohistopatolojik olarak değerlendirilip görüntüledi.

İstatistiksel Analiz: Çalışmamızda elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPSS (IBM® Ver; 21.0 Windows, Chicago, Amerika) istatistik programı kullanılarak yapıldı. Histolojik veriler; rakamsal değerler, ortalama aritmetik değerler(M) ve standart sapma(SD) olarak gösterildi. Verilerin değerlendirilmesinde normal dağılım göstermeyen verilerin ikili grup arasındaki karşılaştırmada Mann Whitney U testi ve ikiden fazla gruplar arası karşılaştırmalarda Kruskal Wallis testi kullanıldı. İkiden fazla grupların karşılaştırılmasında Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi yapıldı. Bütün istatistiksel testlerde p<0.05 değeri anlamlı olarak kabul edildi.

Bulgular

Deney hayvanları cerrahi operasyon sonrasında önceden hazırlanmış uygun ortam koşullarının sağlandığı kafeslerde 26. ve 52. günlük iyileşme periyodlarını sorunsuz gerçekleştirmiştir.

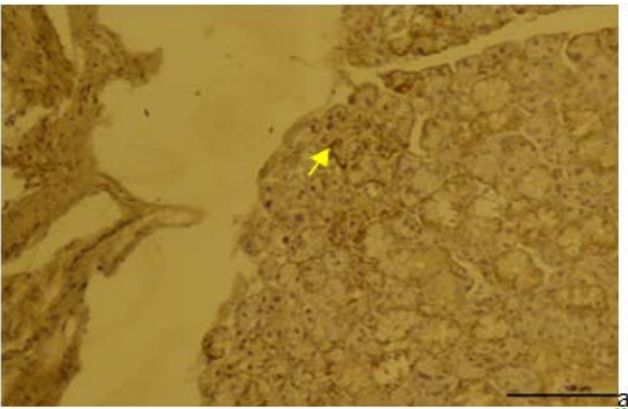
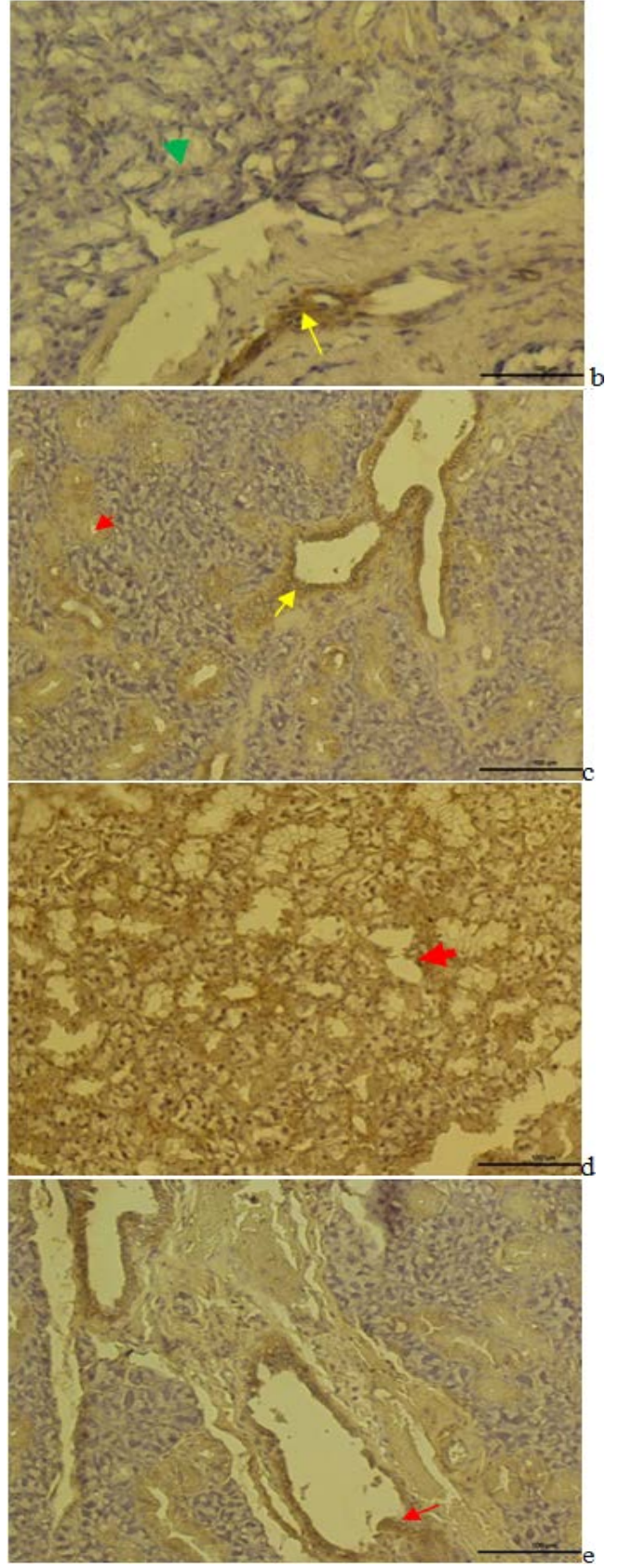
Histolojik Bulguları: H&E boyama prosedürünün bir sonucu olarak, EMA'ya maruziyet sonucunda histopatolojik olarak bazal membranda, hücre nükleuslarında, intralobuler kanalda, hücre görünümünde, vakuoler yapılar, salgı kanallarında, interlobuler alandaki damarlarda değişikliğe neden olduğu tespit edildi (Şekil 1a-g).

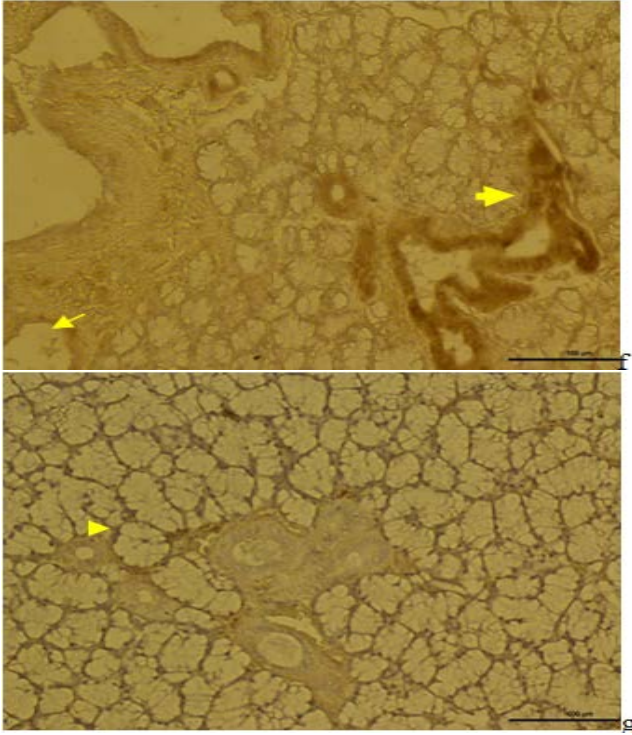


Şekil 1. (a) - Grup 1, müköz bezlerde bazal membranda kalınlaşma hücre nükleuslarında piknosis(sarı ok) ,intralobuler kanalda yer alan hücrelerde dejenerasyon yer yer hyalinizasyon(mavi ok)gözlemlendi.H-E boyama Bar 50µm; (b) Grup 2, müköz ve seröz bezlerdeki hücrelerde proliferasyon ,Hücre nükleuslarında hiperplazi(sarı ok),salgı kanallarındaki hücrelerde dejene-

rasyon ve ayrılma, interlobuler kanaldaki hücrelerde vakuolleşme ve lümenlerinde dilatasyon (kırmızı ok) gözlemlendi. H-E boyama Bar 100µm; (c) Grup 3, Serö-müköz bezlerdeki bazal membran kalınlığı normal görünümde, bez hücrelerinde hafif vakuolleşme, interlobuler bağ dokusu liflerinde artış ve mononükleer hücre infiltrasyonu (mavi ok) gözlemlendi. H-E boyama Bar 100µm; (d) Kontrol grubu, Seröz, serö-müköz bezlerin ve interlobüler kanallarının normal görünümü H-E boyama Bar 50µm; (e) Grup 4, Seröz ve serö-müköz bezlerde apoptotik görünümlü hücreler (sarı ok), vakuoler yapılar genişleme, salgı kanallarında dejenerasyon ve nekrotik oluşum (mavi ok) gözlemlendi. Interlobuler alandaki damarlarda dilatasyon ve hemoraji iltihabi hücre infiltrasyonları (yeşil ok) görüldü. H-E boyama Bar 50µm; (f) Grup 5, bezlerdeki hücrelerde hiperplazi (sarı ok), salgı kanallarında ayrılmalar, interlobuler kanallarda dejenerasyon ve mononükleer hücre infiltrasyonları (yeşil ok) gözlemlendi. H-E boyama Bar 100µm; (g) Grup 6, Bez hücrelerinde hipertrofi (sarı ok), intralobuler kanaldaki hücreler düzenli, bazı bez yapılarında hafif bozulmalar (kırmızı ok) gözlemlendi. H-E boyama Bar 50µm

İmmünohistokimyasal Bulguları: VEGF immün boyama prosedürünün bir sonucu olarak, aşağıdaki sonuçlar elde edildi: Grup 1'de 26. günde yapılan immünohistokimyasal analizde, bazı dejeneratif hücrelerde VEGF ekspresyonu pozitif izlendi (Şekil 2a). Grup 2'de interlobuler alandaki damar endotelinde VEGF pozitif ekspresyonu ve bezlerde zayıf ekspresyon görüldü (Şekil 2b). Grup 3'te intralobuler ve interlobuler kanallarda VEGF ekspresyonunda artış ve damar endotelinde VEGF pozitif olarak izlendi (Şekil 2c). Grup 4'te 52. günde yapılan immünohistokimyasal analizde, dejeneratif hücrelerde ve iltihabi hücre infiltrasyonlarında VEGF pozitif görüldü (Şekil 2d). Grup 5'te intralobuler kanallarda zayıf VEGF ekspresyonu gözlenirken, interlobuler kanallarda hücre proliferasyonu artışı izlendi (Şekil 2e). Grup 6'da intralobuler ve interlobuler kanallarda ve kan damarlarındaki endotel hücrelerinde VEGF ekspresyonunda artış görüldü (Şekil 2f). Grup 7'de bezlerin bazal membranlarında VEGF ekspresyonu, intra ve interlobuler kanallarda VEGF ekspresyonu izlendi (Şekil 2g).

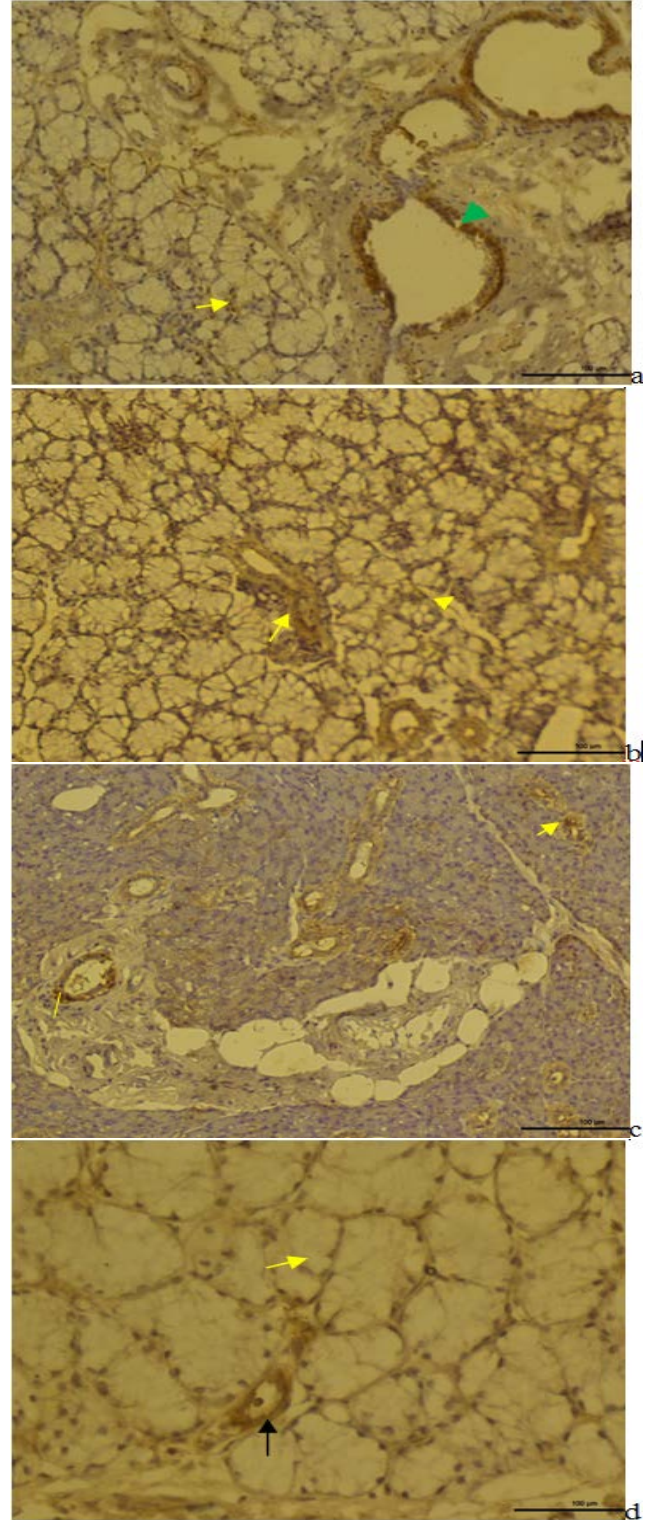


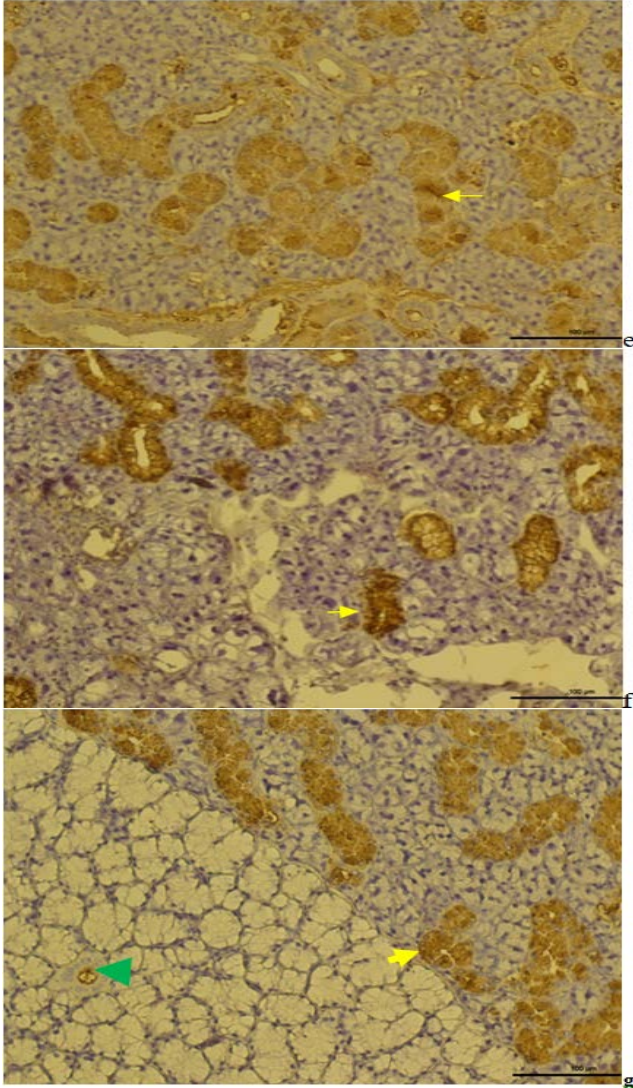


Şekil 2. (a) Grup 1'de Bezlerdeki bazı dejeneratif hücrelerde VEGF ekspresyonu pozitif(sarı ok) VEGF immün Boyama Bar 50µm (b) Grup 2 de İnterlobuler alandaki damar endotelinde VEGF pozitif ekspresyonu(sarı ok),Bezlerde zayıf ekspresyon(yeşil ok), VEGF immün Boyama Bar 50µm (c) Grup 3'te İnterlobuler ve interlobuler kanallarda VEGF ekspresyonunda artış(sarı ok),Damar endotelinde VEGF pozitif(kırmızı ok),VEGF immün Boyama Bar 100µm (d) Grup 4'te Dejeneratif hücrelerde ve iltihabi hücre infiltrasyonlarında VEGF pozitif(kırmızı ok),VEGF immün Boyama Bar 100µm (e) Grup 5'te İnterlobuler kanallarda zayıf VEGF ekspresyonu gözlenirken interlobuler kanallarda hücre proliferasyonu artışı ile birlikte VEGF ekspresyonu belirgin ayrıca lobüller arası damarlardaki VEGF ekspresyonu(kırmızı ok),VEGF immün Boyama Bar 100µm (f) Grup 6'da İnterlobuler ve interlobuler kanallarda ve kan damarlarındaki endotel hücrelerinde VEGF ekspresyonunda artış(sarı ok),VEGF immün Boyama Bar 100µm (g) Kontrol grubunda Bezlerin Bazal membranlarında VEGF ekspresyonu,intra ve interlobuler kanallarda VEGF ekspresyonu(sarı ok) VEGF immün Boyama Bar 100µm

E-cadherin immün boyama prosedürünün bir sonucu olarak, aşağıdaki sonuçlar elde edildi: Grup 1'de 26. günde yapılan immünohistokimyasal analizde, bez hücrelerindeki bağlantı ve yapışmada ayrılmalarda E-cadherin zayıf ekspresyon ve interlobuler kanallarda kesintili olan belirgin E-cadherin izlendi (Şekil 3a). Grup 2'de bazı bez hücrelerinde E-cadherin ekspresyonu, intralobuler ve interlobuler kanallarda orta dereceli E-cadherin ekspresyonu görüldü (Şekil-3b). Grup 3'te İnterlobuler ve interlobuler kanallarda belirgin E-cadherin ekspresyonu izlendi (Şekil 3c). Grup 4'te 52.günde yapılan immünohistokimyasal analizde, bez hücreleri arasındaki aralıkta genişleme, E-cadherin eksp-

resyonu zayıf, kan damarlarındaki bazal membranda ekspresyon pozitif görüldü (Şekil 3d). Grup 5'te İnterlobuler ve interlobuler kanallarda E-cadherin ekspresyonu belirgin (Şekil 3e). Grup 6'da bezler arasındaki kanallarda yoğun E-cadherin ekspresyonu izlendi (Şekil 3f). Grup 7'de seröz bezlerin arasındaki kanallarda E-cadherin ekspresyonu yoğun, müköz bezlerde salgı kanal lümeninde ekspresyon belirgin (Şekil 3g).





Şekil 3. (a) 26gün YG,Bez hücrelerindeki bağlantı ve yapışmada ayrılmalarda E-cadherin zayıf ekspresyon(sarı ok),İnterlobuler kanallarda kesintili olan belirgin E-cadherin(yeşil ok),E-cadherin immun Boyama Bar 100µm (b) YG+Gonoderma Bazı bez hücrelerinde E-cadherin ekspresyonu,intralobuler ve interlobuler kanallarda orta dereceli E-cadherin ekspresyonu(sarı ok),E-cadherinin immun Boyama Bar 100µm (c) 26.gün YG+Melatonin İnterlobuler ve interlobuler kanallarda belirgin E-cadherin ekspresyonu(sarı ok),E-cadherin immun Boyama Bar 100µm (d) 52 gün YG uygulanan grup Bez hücreleri arasındaki aralıkta genişleme(sarı ok),E-cadherin ekspresyonu zayıf,Kan damarlarındaki bazal membranda ekspresyon pozitif E-cadherin(siyah ok) immun Boyama Bar 50µm (e) 52 gün YG+Gonoderma uygulanan grup İnterlobuler ve interlobuler kanallarda E-cadherin ekspresyon belirgin(sarı ok) E-cadherin immun Boyama Bar 100µm (f) 52 gün YG+Melatonin Bezler arasındaki kanallarda yoğun E-cadherin ekspresyonu (sarı ok) E-cadherinin immun Boyama Bar 50µm (g) 52.gün control Seröz bezlerin arasındaki kanallarda E-cadherin ekspresyonu yoğun(sarı ok),Müköz bezlerde salgı kanal lümeninde ekspresyon belirgin E-cadherinin immun Boyama Bar 100µm.

Histopatolojik Bulgular

Sıçanların tükürük bezlerinden 26. ve 52. günde alınan örneklerin histopatolojik incelemesinde; hücre dejenerasyonu, iltihabi hücre infiltrasyonu, İntra ve interlobuler kanallarda dejenerasyon ve kan damarlarında dilatasyon ve hemoraji skorların değerleri, tüm gruplar arasında karşılaştırılmasında Kruskal Wallis testi uygulandı ve tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (Tablo 1) ($p < 0.001$).

Kruskal Wallis testinde anlamlı çıkan 26. günlük gruplara bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi uygulanmıştır. Hücre dejenerasyonu skorlarının gruplar arası karşılaştırılmasında; grup 1 ile grup 3, grup 1 ile grup 7, grup 2 ile grup 3 ve grup 2 ile grup 7'de anlamlı fark bulunmuştur. İltihabi hücre infiltrasyonu skorlarının gruplar arası karşılaştırılmasında; grup 1 ile grup 3, grup 1 ile grup 7, grup 2 ile grup 3, grup 2 ile grup 7 ve grup 3 ile grup 7'de anlamlı fark bulunmuştur. İntra ve interlobuler kanallarda dejenerasyon skorlarının gruplar arası karşılaştırılmasında; grup 1 ile grup 3, grup 1 ile grup 7, grup 2 ile grup 7 ve grup 3 ile grup 7'de anlamlı fark bulunmuştur. Kan damarlarında dilatasyon ve hemoraji skorlarının gruplar arası karşılaştırılmasında; grup 1 ile grup 7, grup 2 ile grup 7 ve grup 3 ile grup 7'de istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (Tablo 1).

Kruskal Wallis testinde anlamlı çıkan 52. günlük sıçanların bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi uygulanmıştır. İltihabi hücre infiltrasyonu ve Kan damarlarında dilatasyon ve hemoraji skorlarının gruplar arası karşılaştırılmasında; bütün gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur. Hücre dejenerasyonu skorlarının gruplar arası karşılaştırılmasında; grup 5 ile grup 6 dışındaki bütün gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur. İntra ve interlobuler kanallarda dejenerasyon skorlarının gruplar arası karşılaştırılmasında; grup 4 ile grup 5 dışındaki diğer gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur (Tablo 2).

Tartışma

Elektronik cihazların ve cep telefonların yaygın kullanımı sonucunda bunlardan yayılan elektromagnetik alan radyasyonunun insan sağlığı üzerinde önemli bir sağlık sorunu haline gelmektedir. Radyofrekans dalgaların insan sağlığı üzerindeki etkileri önceki çalışmalarda rapor edilmiştir (23-25). İjiri ve ark. (26) yaptıkları çalışmada 10 saat boyunca darbeli EMA kullandı. Buna karşı Matsumoto ve arkadaşları (27) iki grup olarak günde 4 ve 8 saat olmak üzere iki farklı zaman diliminde atımlı EMA uygulaması kullanmıştır. Bizim çalışmamızda da, 10.000 V'den manyetik alan yoğunluğu 2.48 µT ve elektrik alan şiddeti 80.3 V/m olarak oluşturulmuştur ve her gün 8 saat olarak EMA uygulanması planlandı.

Tablo 1. Sıçanların 26. Günde Histopatolojik Değerlerin Karşılaştırılması

	Grup 1 (M±SD)	Grup 2 (M±SD)	Grup 3 (M±SD)	Kontrol (M±SD)	P	p ₁₋₂	p ₁₋₃	p ₁₋₇	p ₂₋₃	p ₂₋₇	p ₃₋₇
Hücre dejenerasyonu	3,14±0,69	2,57±0,54	0,86±0,69	0,43±0,54	p<0.001**	0.114	0.002*	0.001*	0.002*	0.001*	0.225
İltihabi hücre infiltrasyonu	2,71±0,49	2,86±0,38	1,57±0,54	0,29±0,49	p<0.001**	0.053	0.005*	0.001*	0.002*	0.001*	0.004*
Intra ve interlobuler kanallarda dejenerasyon	3,00±0,58	2,43±0,54	2,29±0,49	0,43±0,54	p<0.001**	0.081	0.032*	0.001*	0.591	0.001*	0.001*
Kan damarlarında dilatasyon ve hemoraji	2,14±0,38	2,00±0,82	1,71±0,49	0,14±0,38	p<0.001**	0.708	0.091	0.001*	0.473	0.002*	0.001*

Değerler, M (aritmetik ortalama) ±SD (standart sapma) şeklinde verilmiştir.

* p <0.05, gruplar arasındaki anlamlı,

** p ≤0.001, gruplar arasındaki çok anlamlı,

P, Kruskal Wallis testi; p₁₋₂, p₁₋₃, p₁₋₇, p₂₋₃, p₂₋₇ ve p₃₋₇, Mann Whitney U testi

Tablo 2. Sıçanların 52. Günde Histopatolojik Değerlerin Karşılaştırılması

	Grup 4 (M±SD)	Grup 5 (M±SD)	Grup 6 (M±SD)	Kontrol (M±SD)	p	p ₄₋₅	p ₄₋₆	p ₄₋₇	p ₅₋₆	p ₅₋₇	p ₆₋₇
Hücre dejenerasyonu	3,71±0,49	1,86±0,38	1,43±0,54	0,43±0,54	p<0.001**	0.001*	0.001*	0.001*	0.107	0.002*	0.010*
İltihabi hücre infiltrasyonu	3,00±0,58	2,00±0,58	1,14±0,69	0,29±0,49	p<0.001**	0.010*	0.002*	0.001*	0.030*	0.002*	0.026*
Intra ve interlobuler kanallarda dejenerasyon	3,14±0,69	2,43±0,79	1,57±0,54	0,43±0,54	p<0.001**	0.101	0.003*	0.001*	0.041*	0.002*	0.006*
Kan damarlarında dilatasyon ve hemoraji	3,71±0,49	2,57±0,54	0,86±0,69	0,14±0,38	p<0.001**	0.005*	0.001*	0.001*	0.002*	0.001*	0.035*

Değerler, M (aritmetik ortalama) ±SD (standart sapma) şeklinde verilmiştir.

* p <0.05, gruplar arasındaki anlamlı,

** p ≤0.001, gruplar arasındaki çok anlamlı,

P, Kruskal Wallis testi; p₄₋₅, p₄₋₆, p₄₋₇, p₅₋₆, p₅₋₇ ve p₆₋₇, Mann Whitney U testi

EMA'nın oral dokular üzerinde klinik ve laboratuvar da yapılan çok sınırlı sayıda çalışma var. Bunlardan biri olan EMA stimülasyonu geleneksel periodontal tedaviye ek olarak, klinikte klinik ataçman kazancında veya alveolar kemik seviyesinde herhangi bir ilerlemede artış sağlamadığı belirtilmiştir (28). Diğer bir çalışmada, doğrudan elektrik akımının güçlü bir biyolojik araç olduğunu ve hücresel enzimatik fosforilasyonu aktivitesi etkileyerek periodontal dokunun, alveolar kemiğin turnover ve parotis bezindeki tükürük salgısını başlangıçta hızlandırır (29,30).

Hamzany ve ark. (31) yaptığı bir çalışmada, cep telefonu kullanıcılarında, çalışılan tüm tükürük oksidatif stres indekslerinde anlamlı artış olduğu bildirmiştir. Buna karşın cep telefonlarından salınan EMA'ların; tükürük akışı, toplam protein, albümin ve amilaz aktivitesinde ve iltihabi süreçlerde artış ve tükürük oksidanlardaki değişimlerle herhangi bir ilişkisi yoktur(32). Bizim çalışmamızda da hem 26. ve 52. günde EMA grubu kontrol grubuna göre iltihabi hücre infiltrasyonu ve kan damarlarında dilatasyon ve hemorajide, anlamlı düzeyde artış görülmesi bu çalışmanın bulgularıyla örtüşmektedir.

Tükürük içindeki oksidan/antioksidan maddelerin düzeyi EMA'nın zararlı etkisi olarak düşünülmektedir. Periodontal sağlık durumunun oksidatif stres sonrası tükürük bileşenlerindeki oksidan/ antioksidan maddelerin miktarıyla ilişkilidir(33,34).

Baz istasyonların yakınında ikamet eden bireylerin tükürük salgısı ve tükürük tamponlama kapasitesi düşük olduğu bildirilmiştir. Bunun nedenin EMA'ya maruziyetin tükürük bezlerin disfonksiyonu ve asiner hücrelerin plazma membranların zarar görmesi olarak rapor edilmiştir (35). Bizim çalışmamızda da hem 26. ve 52. günde EMA grubu kontrol grubuna göre tükürük bezlerdeki hücre dejenerasyonu ve intra ve interlobuler kanallarda dejenerasyon anlamlı düzeyde artış görülmüştür.

MLT'nin vücut sıvılarındaki konsantrasyonu farklıdır. MLT kandaki seviyesi tükürükteki seviyesine nazaran daha düşüktür. Organlardaki hücrelerdeki MLT oranları farklıdır. En fazla MLT miktarı kan ürünlerin yapıldığı yerlerdir (36). MLT majör tükürük bezlerindeki (seröz ve müköz) dolaşımı serbest olmaktadır (37). MLT gece boyunca salgısı artmaktadır. EMA'ların gece boyunca MLT'nin salınımını baskıla-

diği ifade edilmiştir (38). Ayrıca EMA'lara maruz kalma, melatonin konsantrasyonunun azalmasına neden olmaktadır (12).

GL'nin toz halindeki sulu formu, S.aureus'un sporlarına karşı duyarlıdır. GL, enfeksiyon tedavilerde önleyici ve tedavi edicidir. Bu nedenle inatçı periodontitis, süpüratif tükürük bezi hastalıklarında ve kanser geçiren hastaların tedavisinde hem klinik hem de laboratuvar bulguları birbirini desteklediğini bildirilmiştir (39). Bu çalışmada yüksek voltajdan üretilen EMA'nın tükürük bezleri üzerindeki zararlı etkileri incelendi ve antioksidanların (MLT ve GL) bu zararlı etkileri azaltabilirler. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, histopatolojik ve immunohistokimyasal incelemesinde EMA tükürük bezleri etkilediği görülmüştür. Yüksek voltajdan üretilen EMA; hücre dejenerasyonu, intra ve interlobuler kanallarda dejenerasyon, iltihabi hücre infiltrasyonu ve kan damarlarında dilatasyon ve hemorajide artışa neden olduğu belirlendi. EMA maruziyet süresinde artış olması, görülen hasarda artış olmasına neden olmuştur. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, en az hasar 26. ve 52. günde EMA+MLT'nin uygulandığı gruplarda görüldü. MLT uygulanan gruplar GL uygulanan gruplara nazaran EMA'nın zararlı etkisi daha az derecede görülmektedir.

VEGF; intralobuler kanal hücrelerinde, normal tükürük bezlerindeki hücrelerde, VEGF mRNA ve proteinde az veya çok bulunabilir. VEGF'nin miktarı ağız boşluğundaki hasarın iyileşmesini, yeni damar oluşumunu ve mukozal membran yapısının korunmasında önemli rol oynayabilir. Özellikle seröz bezler arasındaki intralobuler kanallarda artması, VEGF'nin geçirgenliğin artması, tükürük üretiminin düzenlenmesini sağlaması yönünden önemli sayılabilir. E-kadherin yapışma reseptörü, epitel hücrelerinin farklılaşmasında asinüs ve kanalların gelişiminde ve organizasyonda önemli görevlere sahiptir. E-kadherin fonksiyonlarının asiner ve duktal yapıların oluşumu, hücre yapışma ve düzenlemede etkili olduğu çalışmamızda immunohistokimyasal değerlendirme ile desteklenmiştir.

Çalışmamıza benzer olarak tükürük bezleri ile ilgili immunohistokimyasal analiz yapılan bir çalışmaya rastlanmıştır. Çalışmamızda 26. ve 52. gündeki sıçanlarda VEGF ve E-kadherin ekspresyonu bütün deney grupları kontrol grubuna göre pozitif bulunmuştur. Bunun nedeni tükürük bezlerindeki hasarlı dokularda iyileşme, yeni kan damarları ve bez kanallarının oluşumundan kaynaklanmış olabilir. Sonuç olarak bu çalışmada; EMA'ların zararlı olduğu ve EMA'ların yoğunluğuna ve sıklığına bağlı olarak tükürük üzerinde olumsuz etki yapabileceği sonucuna varılabilir. Tükürük bezlerin yapısında oluşan değişimlerin diş çürüğü ve oral sağlık için önemlidir. Bu değişimler beslenme ve yaşam standartının yükseltilmesi için vazgeçilmez öneme sahiptir. Antioksidan özelliğe sahip olan MLT ve GL, EMA'ya maruz kalınması sonucu tükürük bezlerde oluşan hasarların azaltılmasını sağlamaktadır. Bu nedenle, EMA'in bulunduğu alanlarda çalışan insanların, MLT içeren tedavi

prosedürlerin yapılması faydalı olabilmektedir. Bu konuda kesin tedavi prosedürlerin yapılması için daha fazla ileri çalışmaya ihtiyaç vardır.

Kaynaklar

1. Li K, Ma S, Ren D, Li Y, Ding G, Liu J, Guo Y, Guo G. Effects of electromagnetic pulse on serum element levels in rat. *Biol Trace Elem Res.* 2014;158(1):81-6.
2. Sullivan K, Balin AK, Allen RG. Effects of static magnetic fields on the growth of various types of human cells. *Bioelectromagnetics.* 2011;32(2):140-7.
3. Oksay T, Naziroglu M, Dogan S, et al. Protective effects of melatonin against oxidative injury in rat testis induced by wireless (2.45 GHz) devices. *Andrologia.* 2014;46(1):65-72.
4. Frahm J, Lantow M, Lupke M, Weiss DG, Simkó M. Alteration in cellular functions in mouse macrophages after exposure to 50 Hz magnetic fields. *J Cell Biochem.* 2006;99(1):168-77.
5. Roda-Murillo O, Roda-Moreno JA, Morente-Chiquero MT. Effects of Low-frequency Magnetic Fields on Different Parameters of Embryo of Gallus Domesticus. *Electromagn Biol Med.* 2005;24(1):55-62.
6. Ivancsits S, Diem E, Pilger A, Rudiger H.W, Jahn O. Induction of DNA strand breaks by intermittent exposure to extremely-low-frequency electromagnetic fields in human diploid fibroblasts. *Mutat Res.* 2002;519 (1-2): 1 - 13.
7. Lai H, Singh NP. Acute Exposure to a 60 Hz Magnetic Field Increases DNA Strand Breaks in Rat Brain Cells. *Bioelectromagnetics.* 1997;18:156-165.
8. Tranfo G, Pignini D, Brugaletta V, et al. Measures of melatonin and cortisol variations in volunteers exposed to GSM cellular phones in a double blind experiment. *Webmedcentral Environ Med.* 2010;1(9):1-25.
9. Slominski RM, Reiter RJ, Schlabritz-Lautsevich N, Ostrom RS, Slominski A. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions. *Mol Cell Endocrinol* 2012;351:152-166.
10. Reiter R, Rosales-Corral S, Liu X, Acuna-Castroviejo D, Escames G, Tan D. Melatonin in the oral cavity: physiological and pathological implications. *J Periodontol Res.* 2015;50(1):9-17.
11. Galano A, Tan D. X, Reiter R. J. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. *J. Pineal Res.* 2011; 51(1), 1-16.
12. Karasek M, Woldanska-Okonska M, Czernicki J, Zylinska K, Swietoslawski J. Chronic exposure to 2,9 mT, 40Hz magnetic field reduces melatonin concentrations in humans, *J. Pineal Res.* 1998; 25(4):240-244.
13. Mau JL, Lin HC, Chen CC. Non-volatile components of several medicinal mushrooms. *Food Res Int.* 2001;34(6):521-6.
14. Boh B, Berovic M, Zhang J, Zhi-Bin L. *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds. *Biotechnol Annu Rev.* 2007; 13:265-301.
15. Zhou X, Lin J, Yin Y, Zhao J, Sun X, Tang K. *Ganodermataceae*: natural products and their related pharmacological functions. *Am J Chin Med.* 2007;35(4):559-74.
16. Suarez-Arroyo IJ, Rosario-Acevedo R, Aguilar-Perez A, et al. Antitumor effects of *Ganoderma lucidum* (reishi) in inflammatory breast cancer in vivo and in vitro models. *PLoS One.* 2013;8(2):57431.
17. Paterson RR. *Ganoderma A Therapeutic Fungal Biofactory.* *Phytochemistry.* 2006;67(18):1985-2001.
18. Humphrey S.P, Williamson R.T. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *J. Prosthet Dent.* 2001;85:162-9.
19. Streckfus CF, Bigler LR. Saliva as a diagnostic fluid. *Oral Dis.* 2002;8: 69-76.
20. Kinney JS, Morelli T, Oh M, Braun TM, Ramseier CA, Sugai JV,

- Giannobile WV. Crevicular fluid biomarkers and periodontal disease progression. *J Clin Periodontol.* 2014;41(2):113-120.
21. Ramseier CA, Kinney JS, Herr AE, et al. Identification of pathogen and host-response markers correlated with periodontal disease. *J Periodontol.* 2009;80(3):436-46.
 22. Ciftçi ZZ, Kirzioğlu Z, Nazıroğlu M, et al. Effects of prenatal and postnatal exposure of Wi-Fi on development of teeth and changes in teeth element concentration in rats. *Biol Trace Elem Res.* 2015;163(1-2):193-201.
 23. Dasdag S, Yavuz I, Bakkal M, et al. Effect of long term 900 MHz radio frequency radiation on enamel microhardness of rat's teeth. *Oral Health Dent Manage.* 2014;13 (3):749-752.
 24. Doğan M. S, Yavaş M C., Günay A, Yavuz İ, et al. The protective effect of melatonin and Ganoderma lucidum against the negative effects of extremely low frequency electric and magnetic fields on pulp structure in rat teeth. *Biotechnology & Biotechnological Equipment,* 2017; 31(5): 979-988.
 25. Koyu A, Gökalp O, Özgüner F, et al. Subkronik 1800 MHz elektromanyetik alan uygulamasının TSH, T3, T4, kortizol ve testosteron hormon düzeylerine etkileri. *Genel Tıp Derg* 2005;15:101-5.
 26. Ijiri K, Matsunaga S, Fukuyama K, Maeda S, Sakou T, Kitano M, et al. The effect of pulsing electromagnetic field on bone ingrowth into a porous coated implant. *Anticancer Res* 1996;16:2853-6.
 27. Matsumoto H, Ochi M, Abiko Y, Hirose Y, Kaku T, Sakaguchi K. Pulsed electromagnetic fields promote bone formation around dental implants inserted into the femur of rabbits. *Clin Oral Implants Res.* 2000;11:354-60.
 28. Steffensen B, Caffesse RG, Hanks CT, Avery JK, Wright N. Clinical effects of electromagnetic stimulation as an adjunct to periodontal therapy. *J Periodontol.* 1988;59(1):46-52.
 29. Kaya S, Celik MS, Akdag MZ, et al. The Effects of extremely low frequency magnetic field and Mangan to the oral tissues. *Biotechnol Biotechnol Equip.* 2008;22(3):869-873.
 30. Goldwein O, Aframian DJ. The influence of handheld mobile phones on human parotid gland secretion. *Oral Dis.* 2010;16(2):146-50.
 31. Hamzany Y, Feinmesser R, Shpitzer T, et al. Is human saliva an indicator of the adverse health effects of using mobile phones? *Antioxid. Redox Signal.* 2013;18:622-7.
 32. Khalil AM, Abu Khadra KM, Aljaberi AM, Gagaa MH, Issa HS. Assessment of oxidant/antioxidant status in saliva of cell phone users. *Electromagn Biol Med.* 2014;33(2):92-7.
 33. Borges I Jr, Moreira EA, Filho DW, de Oliveira TB, da Silva MB, Fröde TS. Proinflammatory and oxidative stress markers in patients with periodontal disease. *Mediators Inflamm.* 2007;2007:45794.
 34. Abu Khadra K.M, Khalil A.M, Abu Samak M, Aljaberi A. Evaluation of selected biochemical parameters in the saliva of young males using mobile phones. *Electromagnetic biology and medicine,* 2015;34(1):72-76.
 35. Singh K, Nagaraj A, Yousuf A, Ganta S, Pareek S, Vishnani P. Effect of electromagnetic radiations from mobile phone base stations on general health and salivary function. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2016;6(1):54-9.
 36. Altpeter ES, Rösli M, Battaglia M, Pfluger D, Minder CE, Abelin T. Effect of short-wave (6-22 MHz) magnetic fields on sleep quality and melatonin cycle in humans: the Schwarzenburg shut-down study. *Bioelectromagnetics.* 2006;27(2):142-50.
 37. Reiter RJ, Rosales-Corral SA, Liu XY, Acuna-Castroviejo D, Escames G, Tan DX. Melatonin in the oral cavity: physiological and pathological implications. *J Periodontal Res.* 2015;50(1):9-17.
 38. Jarupat S, Kawabata A, Tokura H, Borkiewicz A. Effects of the 1900 MHz electromagnetic field emitted from cellular phone on nocturnal melatonin secretion. *J Physiol Anthropol Appl Human Sci* 2003;22(1):61-3.
 39. Nayak RN, Dixitraj PT, Nayak A, Bhat K. Evaluation of antimicrobial activity of spore powder of Ganoderma lucidum on clinical isolates of *Prevotella intermedia*: A pilot study. *Contemp Clin Dent.* 2015;6(1):248-52.