

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Kronik ve Agresif Periodontitis Hastalarında Wnt/ β -Catenin Sinyal Yolağının Değerlendirilmesi” başlıklı tez çalışması; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan klinik çalışma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler ve yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Doktora Öğrencisinin Adı Soyadı : Zeliha Güney

Tarih :

İmza :

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Periodontoloji Anabilim Dalı'nda

Zeliha GÜNEY tarafından hazırlanan

“Kronik ve Agresif Periodontitis Hastalarında Wnt / β -Catenin Sinyal Yolağının Değerlendirilmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

İmza

Prof. Dr. Meral GÜNHAN

Ankara Üniversitesi

Jüri Başkanı

İmza

Prof. Dr. ...

Üniversitesi

Raportör

imza

Prof. Dr.

Üniversitesi

üye

İmza

Prof. Dr. ...

Üniversitesi

Üye

imza

Prof. Dr.

Üniversitesi

üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Prof. Dr. Mehmet AKAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	ix
Çizelgeler	x
1.GİRİŞ	1
1.1.Periodontal Hastalık Sınıflandırması-1999 Sınıflandırması	2
1.1.1.Agresif ve Kronik Periodontitisin Özellikleri	5
1.1.2.Agresif ve Kronik Periodontitis Arasındaki Farklılıklar	5
1.2.Periodontal Hastalık ve Durumların Sınıflandırması- 2017 Sınıflandırması	11
1.3.Periodontitis Patogenezi	13
1.3.1.Programlanmış Hücre Ölümü-İnflamasyon İlişkisi	18
1.3.2.Hasarla ilişkili moleküler paternler (DAMP)	20
1.3.3.Periodontitis patogenezinde DAMP'ın rolü	22
1.4.Wnt/ β -catenin Sinyal Yolağı	23
1.4.1. β -catenin	27
1.4.2. Wnt proteinleri	28
1.4.3.RunX-2	30
2.GEREÇ VE YÖNTEM	32
2.1. Çalışma Dizaynı ve Örneklem Seçimi	32
2.2. Çalışma Gruplarının Belirlenmesi	33
2.2.1. Bireylerin Periodontal Durumlarının Belirlenmesi	34
2.2.1.1.Sondalama Derinliğinin Belirlenmesi	34
2.2.1.2.Dişeti Çekilmesinin Belirlenmesi	35
2.2.1.3.Klinik Ataçman Kaybının Belirlenmesi	35
2.2.1.4.Dental Plak Varlığı ve Birikim Düzeyinin Belirlenmesi	35
2.2.1.5.Dişetinde Klinik İltihap Varlığı ve Şiddetinin Belirlenmesi	36

2.2.1.6.Sondlamada Dişeti Kanamasının Belirlenmesi	37
2.3.Doku Örneklerinin Toplanması	37
2.4.Deneylerin Uygulanması	38
2.4.1.Dişeti Dokusunda Wnt 5a, Wnt 10b ve β -Catenin Yoğunluklarının İmmunohistokimyasal Analiz Yöntemi ile Değerlendirilmesi	38
2.4.1.1.Epitel Özellikleri	39
2.4.1.2.Sub-epitelyal İnflamasyon Yoğunluğu	39
2.4.1.3.Wnt 5a, Wnt 10b ve β -Catenin için İmmunohistokimyasal Değerlendirme	40
2.4.2.Dişeti Dokusunda TNF- α , Wnt 3a, Wnt 5a, Wnt 10b, β -Catenin ve Runx2 Gen Ekspresyonlarının Realtime PCR ile Değerlendirilmesi	40
2.4.2.1.Doku Parçalama ve RNA İzolasyonu	40
2.4.2.2.cDNA Sentezi	42
2.4.2.3.Realtime PCR ile Ekspresyon Çalışması	42
2.4.2.4.İstatistiksel Analiz	42
3.BULGULAR	44
3.1. Periodontal Hastalık ve Kontrol Gruplarındaki Tanımlayıcı Bulgular	44
3.2. Klinik Bulgular	44
3.3. PCR Analizi Bulguları	46
3.4. İmmunohistokimyasal Analiz Bulguları	47
3.5. PCR Verileri ile Klinik Periodontal Verilerin Korelasyonu	54
4. TARTIŞMA	56
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	70
ÖZET	72
SUMMARY	74
KAYNAKLAR	76
EKLER	97
Ek-1: Etik Kurul Onayı	97
Ek-2: Gönüllü Olur Formu	102
Özgeçmiş	105

ÖNSÖZ

Periodontitis patogeneğinde etkili sinyal yollarından biri olan Wnt / β -catenin sinyal yolağının agresif ve kronik periodontitis olgularındaki davranışlarını değerlendirmeyi amaçladığımız bu tez çalışmasında dişeti dokusuna ait biyopsi örneklerinde TNF- α , β -catenin, Wnt 3a, Wnt 5a, Wnt 10b, Runx2 seviyeleri arasındaki ilişki incelenmiştir.

Doktora eğitimim süresince bilgi ve desteklerini benden esirgemeyen başta Prof. Dr. M. Murat Akkaya olmak üzere tüm anabilim dalı öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Doktora eğitimim süresince sahip olduğu deneyimi ve bilgi birikimini benden esirgemeyip, bir akademisyen olarak yol göstericiliğinin, emeklerinin yanı sıra; bir anne sevgisi ve şefkatiyle hayata bakış açımı değiştiren, mutluluğu her şeyin önünde tutmamı öğütleyen, hoca-öğrenci ilişkisinin nasıl arkadaşlığı barındırdığını gösteren, her zaman yanımda olan ve olmaya devam edeceğini bildiğim canım hocam Prof. Dr. Meral Günhan'a,

Bilgisiyle, düşünme şekliyle, yol göstericiliğiyle beni her zaman kendisine hayran bırakan, bir gün onun yaptıklarının yarısını yapabilmeyi umut ettiğim, varlığına her gün şükrettiğim canım ablam Doç. Dr. Şivge Kurgan'a,

Bölüme geldiğim ilk günden beri desteğini asla esirgemeyen, her zaman yanımda olan, neşesine, enerjisine hayran olduğum, ışığıyla yol gösteren canım ablam Doç. Dr. Canan Önder'e,

Arkadaşlığıyla, bilgisiyle, desteğiyle hep yanımda olan, lisans eğitimimden doktora sürecime kadar hep varlığını hissettiren, kendisinden çok şey öğrendiğim canım ablam Doç. Dr. Fatma Karacaoğlu'na,

Elinin değdiği her şeyi güzelleştiren, her zaman yanımda olan ve bana güvenen, desteğini asla esirgeyen değerli hocam Prof. Dr. Elif Ünsal’a,

Her konuşmamızda onun bilgisi karşısında büyülendiğim, her türlü zihni sinir projemi dinleyip mantık çerçevesine oturtan, insanlığına hayran olduğum değerli hocam Prof. Dr. Ömer Günhan’a,

Doktora eğitimimin son döneminde kendisini tanıdığım ve tanıdığım her güne şükrettiğim değerli hocam Prof. Dr. Muhittin Serdar’a,

Doktora çalışmamın şekillenmesinde büyük emeği olan, aradaki mesafe ve zaman farkına rağmen her defasında desteğini benden esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Alpdoğan Kantarcı’ya,

En ihtiyacım olduğu anda laboratuvarını bana açan ve bu çalışmayı bitirmemde çok büyük emeği olan değerli hocam Doç. Dr. Armağan Günal ve çalışma arkadaşı Sn. Emrah Özenç’e,

Bölüme geldiğim ilk günden beri her zaman arkamda olduğunu bildiğim, birçok başarımın gizli kahramanı, bugün olduğum klinisyen olmamı kendisine borçlu olduğum, önce abim sonra kıdemlim Dr. Dt. Necmettin Yeta’ya çok teşekkür ederim.

Çok farklı karakterde insanların oluşturduğu en güzel aile olan Perioaile’nin değerli fertleri Dr. Dt. Duygu Yavuzer, Dr. Dt. Rahme Barbaros, Dt. Canan Boz, Dt. Eray Aktay, Dt. Deniz Erdil... Dünya sizlerin sayesinde güzel...

Her şeyi kolaylaştıran, anabilim dalımızın kıymetlisi Sn. Ali Sayan’a çok teşekkür ederim.

O küçücük odaya sığdırdığım büyük dünyayı benimle paylaşan güzel insanlar, bu ekibin bir parçası olmaktan her zaman gurur duydum.

SİMGELER VE KISALTMALAR

α	Alfa
A. viscosus	Actinomyces viscosus
A.a.	Aggregatibacter actinomycetemcomitans
AAP	Amerikan Periodontoloji Akademisi
β	Beta
BEH	Bağırsak epitel hücresi
C. rectus	Campylobacter rectus
DAMP	Hasar ilişkili moleküler patern
DÇ	Dişeti çekilmesi
DM	Diabetes mellitus
F. nucleatum	Fusobacterium nucleatum
GAP	Generalize agresif periodontitis
Gİ	Gingival indeks
GKP	Generalize kronik periodontitis
HİP	Hızlı ilerleyen periodontitis
IL	İnterlökin
İGF	İnsan gingival fibroblastı
KAK	Klinik ataçman kaybı
LA _g P	Lokalize agresif periodontitis
LPS	Lipopolisakkarid
NF- κ B	Nükleer faktör κ B
OS	Oksidatif stres
ÖTR	Örüntü tanıma reseptörü
P. gingivalis	Porphyromonas gingivalis
P. intermedia	Prevotella intermedia
P. micra	Parvimonas micra
PAMP	Patojen ilişkili moleküler patern
PGE ₂	Prostaglandin E ₂

PHÖ	Programlanmış hücre ölümü
Pİ	Plak indeksi
RA	Romatoid artrit
ROT	Reaktif oksijen türleri
SD	Sondalama derinliği
SK	Sondalamada kanama
TNF- α	Tümör nekrozis faktör-alfa
T. denticola	Treponema denticola
T. forsythia	Tannerella forsythia
TLR	Toll benzeri reseptör
ZO	Zonula okludens

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Hücre ölümünün doğrudan ve dolaylı nedenleri	14
Şekil 1.2. Hücre ölümü ve ilişkili hücre içi sinyal yolları	17
Şekil 1.3. Düzenlenmiş hücre ölümünün inflamasyon ile ilişkisi	18
Şekil 1.4. Ölmekte olan hücrelerden DAMP salınımı	20
Şekil 1.5. PHÖ- inflamasyon ilişkisi	22
Şekil 1.6. DAMP/PAMP-TLR etkileşimi	23
Şekil 1.7. β -catenin'in hücre içi yerleşimi	25
Şekil 3.1. H&E boyamada inflamasyon şiddetine ait her bir grade için topografik görüntüler	49
Şekil 3.2. β -catenin boyanma yoğunlukları	52
Şekil 3.3. Wnt 5a boyanma yoğunlukları	53
Şekil 3.4. Wnt 10b boyanma yoğunlukları	54

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. 1999 AAP Sınıflamasına Göre Periodontal Hastalık ve Durumların Sınıflandırılması	4
Çizelge 1.2. 2017 Periodontal hastalık ve durum sınıflaması	11
Çizelge 1.3. Periodontitis: Evreleme	12
Çizelge 1.4. Periodontitis: Derecelendirme	12
Çizelge 3.1. Araştırmaya katılan bireylerin cinsiyet dağılımı ve yaş ortalamaları	44
Çizelge 3.2. Klinik Periodontal Parametrelerin Gruplar Arası Karşılaştırması	45
Çizelge 3.3a. RT PCR Bulgularının Gruplar Arası Karşılaştırması	46
Çizelge 3.3b. RT PCR Bulgularının Gruplar Arası Karşılaştırması	47
Çizelge 3.4. H&E ile Boyamada İnflamasyon Yoğunluğu ve Epitelyal Değişikliğin Gruplar Arası Karşılaştırması	48
Çizelge 3.5. İmmunohistokimyasal Boyama Sonucunda Antijenlerin Epitelyal Dokuda İntrastoplazmik Boyanma Yüzdelerinin Gruplar Arası Karşılaştırması	49
Çizelge 3.6. İmmunohistokimyasal Boyama Sonucunda Antijenlerin Epitelyal Dokuda İntranükleer Boyanma Yüzdelerinin Gruplar Arası Karşılaştırması	50
Çizelge 3.7. İmmunohistokimyasal Boyama Sonucunda Antijenlerin Bağ Dokusunda İntrastoplazmik Boyanma Yüzdelerinin Gruplar Arası Karşılaştırması	51
Çizelge 3.8. İmmunohistokimyasal Boyama Sonucunda Antijenlerin Bağ Dokusunda İntranükleer Boyanma Yüzdelerinin Gruplar Arası Karşılaştırması	51
Çizelge 3.9. Klinik Periodontal Parametreler ile Wnt 3a, Wnt 5a, Wnt 10b, β -catenin, RunX2 ve TNF- α PCR Sonuçlarının Korelasyonu	55

1.GİRİŞ

Periodontitis, spesifik mikroorganizmaların veya mikroorganizma gruplarının neden olduğu diş destek dokularının inflamatuvar enfeksiyöz bir hastalığı olarak tanımlanır (Newman ve ark., 2011).

Periodontitis tedavisindeki ilerlemeler; hastalığın epidemiyolojisi, nedenselliği ve patogenezi hakkında elde edilen güncel bilgiler ile geliştirilmiştir (Williams, 2008). 1970’lerde, periodontitis için tek nedensel faktör olarak plağın rolü tartışılmazdı. Bununla birlikte, bu model, periodontal hastalık gelişmeyen zayıf oral hijyene sahip bireyler ve iyi oral hijyen alışkanlığı ve periodontal tedaviye uyuma rağmen periodontitis gelişen bireyler gibi gözlemleri dikkate almamıştır. Bu faktörler, diş bakımına erişimi olmayan Sri Lankalı çay işçilerinin 15 yıllık takibi ile gerçekleştirilen çalışma ile Loe ve meslektaşları (Loe ve ark., 1986) tarafından incelenmiş ve oral hijyen prosedürlerini yerine getirmemesine rağmen periodontitis gelişmeyen bir grubun varlığı doğrulanmıştır. Bu popülasyondaki tüm hastalar bol plak ve kalkulus birikimi göstermiştir ancak hepsinde hastalık gelişmemiş ve gelişenlerde ise aynı şiddette görülmemiştir. Plak bakterilerinin nedensel rolü, dişeti dokularında gelişen inflamatuvar yanıtları başlatması ve sürdürmesi bakımından açıktır. Bununla birlikte, hastalığa yatkınlığın ana belirleyicisi, inflamatuvar yanıtların kendisidir. Koruyucu olan bu savunma işlemlerinin hastalığın klinik belirtilerine yol açan doku hasarının çoğuna neden olması ise şaşırtıcıdır.

Bu özellikler göz önüne alındığında periodontal hastalığın benzeri olmayan bir klinik tablo olduğu söylenebilir. Klasik anlamında bir enfeksiyon değildir. Pek çok enfeksiyon hastalığında, tek bir sorumlu mikroorganizma hastalığa neden olur (örneğin, insan immün yetmezlik virüsü / edinilmiş immün yetmezlik sendromu, sifiliz, tüberküloz vb.) ve bu mikroorganizmanın tanımlanması hastalık tanısı için yeterli olabilir. Periodontal hastalıkta ise, periodontal cepte çok sayıda tür tanımlanabilir ve daha pek çoğu ise henüz kültürlenemedikleri için bilinmemektedir.

Tek bir türün, hatta bir grup türün periodontal hastalığa neden olduğu sonucuna varmak imkansızdır.

Periodontitis patogenezi diğer enfeksiyöz hastalıklardan ayıran başlıca özelliği sert dokunun epitelyal yüzeyle kontakt halinde olduğu benzersiz anatomisinden kaynaklanır. Bu epitelyal yüzeyi kolonize eden bakteriler subgingival aralıkta olmasına rağmen, inflamatuvar cevap doku içinde gelişir. Tüm bu faktörler biyofilmin rolü ve periodontal doku yıkımının önemli bir ögesi olan immun-inflamatuvar yanıtlar hakkındaki bilgilerimizi karmaşık bir hale getirmektedir.

1.1.Periodontal Hastalık Sınıflandırması-1999 Sınıflandırması

Ağız hastalıkları ve durumlarının nedenleri ve patogenezi ile ilişkili bakış açımız, artan bilimsel bilgi ile sürekli olarak değişmektedir. Bunun ışığında, bir sınıflandırma en tutarlı şekilde hastalıkların ve koşulların klinik görünümündeki farklılıklarla tanımlanabilir. 2017 yılına kadar periodontal dokuları etkileyen hastalıklar ve durumlar hakkında uluslararası kabul görmüş ve fikir birliğine ulaşılmış sınıflama sistemi, Amerikan Periodontoloji Akademisi (AAP) tarafından düzenlenen 1999 Uluslararası Periodontal Hastalıkların Sınıflandırılması Çalıştayı kararlarıydı (Armitage, 1999). 1999 sınıflamasına göre periodontal hastalıklar;

- 1-gingival hastalıklar,
- 2- kronik periodontitis,
- 3-agresif periodontitis,
- 4-sistemik hastalıkların bir bulgusu olarak periodontitis,
- 5-kazanılmış ve gelişimsel durum ve deformiteler olmak üzere 5 ana gruba ayrılmıştır (Çizelge 1.1).

1999'da Periodontal Hastalıkların ve Koşulların Sınıflandırılması için Uluslararası Çalıştay sırasında, "yaşa bağlı olan veya ilerleme hızları ile ilgili olan sınıflandırma terminolojilerinin atılmasının akıllıca olacağı" na karar verilmiş ve buna göre, eskiden erken başlangıçlı periodontitis şemsiyesi altında düşünülen oldukça yıkıcı

periodontitis formları, agresif periodontitis olarak yeniden adlandırılmıştır (Armitage, 1999). Çalışma grubuna göre, ayırt edici özellikler hızlı ataçman kaybı, kemik yıkımı ve ailesel kümelenme olarak belirlenmiştir. Sıklıkla var olan ancak evrensel olmayan ikincil bir klinik özellik, mikrobiyal birikintilerin miktarları ile periodontal doku yıkımının şiddeti arasındaki tutarsızlık olarak belirtilmiştir. Ek olarak, lokalize agresif periodontitis, ergenlik döneminde başlangıç gösterirken, generalize agresif periodontitis genellikle 30 yaşın altındaki kişileri etkilemektedir, ancak ileri yaşlarda da başlayabilmektedir (Lang ve ark., 1999).

Yetişkin periodontitisi ile ilgili olarak, “kronik periodontitis” terimi katılımcılar tarafından benimsenmiştir, çünkü yetişkin periodontitisinin yaşa bağlı tanımından daha az kısıtlayıcıdır. Çalıştay sonucunda bu en yaygın periodontitis formu için; yetişkinlerdeki prevalansının daha yüksek olduğu ancak çocuklarda ve ergenlerde de ortaya çıkabildiği, yıkım miktarının lokal faktörlerin miktarı ile uyumlu olduğu, subgingival kalkulus birikiminin sık görülen bir bulgu olduğu ve yavaş ila orta ilerleme hızları gösterebildiği ancak hızlı doku yıkımı dönemleri olabildiği konusunda fikir birliğine varılmıştır (Lindhe ve ark., 1999).

1. Gingival Hastalıklar

Plağa bağlı gingival hastalıklar

Plağa bağlı olmayan gingival lezyonlar

2. Kronik Periodontitis

Lokalize

Generalize

3. Agresif Periodontitis

Lokalize

Generalize

4. Sistemik Hastalıklara Bağlı Periodontitisler

Nekrotizan Periodontal Hastalıklar

Nekrotizan ülseratif gingivitis (NUG)

Nekrotizan ülseratif periodontitis (NUP)

Periodontal Apseler

Gingival apse

Periodontal apse

Perikoronar apse

Endodontik Lezyonlar ile İlişkili Periodontitis

Periodontal-endodontik lezyon

Endodontik-periodontal lezyon

Kombine lezyon

5. Kazanılmış ve Gelişimsel Deformiteler ve Lezyonlar

Plak ile ilişkili gingivitis ve periodontitise neden olabilecek diş ile ilişkili lokalize faktörler

Dişin çevresindeki mukogingival deformiteler

Dişsiz bölgelerdeki mukogingival deformiteler

Oklüzal travma

1.1.1.Agresif ve Kronik Periodontitisin Özellikleri

Kronik periodontitis, periodontitisin en yaygın şeklidir (Flemmig, 1999) ve sıklıkla yetişkinlerde görülür. Etiyolojisi, plak ve diş taşı birikimi ile ilişkilidir ve periodontal yıkım miktarı plak akümülayonu ile orantılıdır. Genellikle yavaş ila orta hızda hastalık ilerleme hızına sahiptir, ancak daha hızlı yıkım dönemleri de görülebilir. Hastalığın ilerleme hızındaki artışlar, normal konak-bakteri etkileşimini etkileyebilecek yerel, sistemik veya çevresel faktörlerin etkisinden kaynaklanabilir. Yerel faktörler (diş anatomisi, mine incisi) plak birikimini etkileyebilir; sistemik hastalıklar (örn. diabetes mellitus, HIV) konağın savunmasını etkileyebilir ve çevresel faktörler (örn. sigara kullanımı, stres) konağın plak birikimine tepkisini etkileyebilir. Hastalık; klinik ataçman kaybı göz önünde bulundurularak, hafif (1-2 mm kayıp), orta (3-4 mm kayıp) veya şiddetli (≥ 5 kayıp) olarak tanımlanabilir.

Agresif periodontitis; klinik olarak sağlıklı bireylerde görülmesi, büyük plak ve kalkulus birikimlerinin olmaması, genetik geçişi düşündüren bir ailede hastalık öyküsünün varlığı ve hastalığın ilerleme hızı ile kronik formdan ayrılır (Novak ve ark., 1996; Tonetti ve ark., 1999). Agresif periodontitis formları genellikle genç bireyleri ergenlik döneminde veya kısa bir süre sonra etkiler ve yaşamın ikinci ve üçüncü on yıllarında görülebilir. Agresif periodontitisin kliniği evrensel gibi görünse de, nedensel faktörler değişkenlik gösterebilir. Etken mikroorganizma olarak *Actinobacillus actinomycetemcomitans*'ın varlığı, fagosit fonksiyon anomalileri, artmış prostaglandin E2 (Pg E2) ve interlekin-1beta (IL-1 β) seviyelerine neden olan hiper duyarlı makrofajların varlığı her vakada saptanamamıştır.

1.1.2.Agresif ve Kronik Periodontitis Arasındaki Farklılıklar

Kronik periodontitis ile agresif periodontitis, hastalığın başlangıç yaşı, ilerleme hızı, inflamasyonun klinik belirtileri, yıkım şekli, mikrobiyolojik özellikler, histopatolojik özellikler, genetik ve çevresel faktörler ve tedaviye verdikleri yanıt bakımından farklılıklar gösterir (Armitage ve Cullinan, 2010).

Her ne kadar 1999 yılında yapılan sınıflama yaş kriterini ortadan kaldırıldıysa da (Armitage, 1999) hastalığın tespit edilme yaşı kronik veya agresif periodontitis ayrımında sıklıkla kullanılmıştır. Ataçman kaybı ve alveol kemik rezorpsiyonu görülen agresif periodontitisli hastalar, benzer hasar görülen kronik periodontitisli hastalardan daha gençtir.

Kronik periodontitis genellikle yavaş ilerlerken, agresif periodontitis hızlı ilerler (Bear, 1971). Baer, agresif periodontitiste görülen ataçman kaybının kronik periodontitisten yaklaşık 3-4 katı daha fazla olduğunu öne sürmüştür. Kronik periodontitisin doğal ilerleme hızı 0.2 mm/yıl (Lindhe ve ark., 1983) iken agresif periodontitiste 0.46 mm/yıl olarak tespit edilmiştir (Löe ve ark., 1986).

Kronik periodontitisli bireylerde agresif periodontitisli bireylere kıyasla daha yoğun bir klinik inflamatuvar yanıt mevcuttur. Tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte; bu farkın hastalığın başlangıcı ve dolayısıyla diş yüzeyinde biriken mikrobiyal yükün miktarı ile ilişki olduğu düşünülmektedir (Armitage ve Cullinan, 2010). Kronik periodontitis hastalarının kök yüzeylerinde genellikle kompleks ve kalın bir biofilm mevcutken (Listgarden, 1976), agresif periodontitis hastalarında gram-negatif kok ve filamentöz bakteriler ile diğer mikroorganizmalardan oluşan ince biofilm mevcuttur (Bear, 1971, Listgarden 1976).

Kronik ve generalize agresif periodontitis vakalarında, yıkım miktarı-plak miktarı arasındaki ilişki farklılık gösterdiğinden her iki hastalık grubunda subgingival mikrofloraların da farklılık gösterebileceği fikri gündeme gelmiştir. Mombelli ve ark.'nın çalışmasında kronik ile agresif periodontitis hastaları arasında *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A.a.*), *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*), *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*) ve *Campylobacter rectus* (*C. rectus*) gibi periodontopatojenlerin varlığı ya da yokluğu açısından bir fark bulunamamış, bununla birlikte agresif periodontitis tanısı konulan hastalarda *A.a.*'nın pozitif olma sıklığının daha fazla olduğu sonucuna varılmıştır (Mombelli ve ark., 2002). Ancak *A.a.*'nın negatif olduğu ve buna rağmen agresif periodontitis tablosuna sahip hastaların da bulunduğu belirtilmiştir.

P. gingivalis'in her iki hastalıkla da yüksek oranda ilişkili olduğu görülmüştür (Gajardo ve ark., 2005). Ancak bu mikroorganizma kronik periodontitisli bireylerin %76.5'inden izole edilirken, generalize agresif periodontitisli bireylerin %100'ünden izole edilmiştir. *Parvimonas micra* (*P. micra*) da her iki hastalıkla ilişkilidir, çalışmaya dahil edilen bireylerin üçte birinde bulunmuştur ve toplam izolasyonların %4'ünü oluşturmaktadır. Kronik periodontitis ile agresif periodontitisin subgingival mikrofloraları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı fark yalnızca *C. rectus* için bulunmuştur. Lafaurie ve ark. (Lafaurie ve ark., 2007), her iki hastalığın subgingival mikroflorasında *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *C. rectus*, *A.a.* ve enterik rodler açısından belirgin bir farklılık bulamamışlardır. Ayrıca periodontal olarak sağlıklı bireylerde de bu bakteriler düşük oranlarda izole edilmiştir. Faveri ve ark., generalize agresif periodontitis teşhisi konulan 10 genç bireyde sondalama derinliğinin 7 mm ve üzeri olduğu bölgelerdeki subgingival mikroflorayı inceledikleri çalışmalarında ise, tüm hastalarda en çok rastlanılan iki tür olarak *Selenomonas* ve *Streptococcus* türleri saptanmışlardır. Hastaların hiçbirinde kırmızı kompleks periodontopatojenlerine rastlanmamıştır (Faveri ve ark., 2008).

Agresif periodontitisteki doku yıkımı; periodontal patojen ile konak cevabı arasındaki etkileşim sonucu başlamaktadır. Hastalıkta her ne kadar yıkımın şiddeti plak miktarı ile doğru orantılı değilse de, lokal inflamasyonun başlaması için mikrobiyal dental plağın bölgede olması şarttır. Bunu destekleyen deliller Waerhaug'ın klasik çalışmalarından gelmektedir (Waerhaug, 1976). Waerhaug otopsi hastaları üzerinde yaptığı bir çalışmada, o dönem için juvenil periodontitisi olarak tanımlanan 1999 AAP sınıflamasında agresif periodontitis grubuna dahil edilen bireylerde ataçman kaybının görüldüğü bölgelerde her zaman subgingival plak bulunduğunu görmüştür. Ayrıca subgingival plağı çevreleyen dokuda da yoğun bir inflamatuvar cevap olduğunu tespit etmiştir. Yine, Waerhaug tarafından yapılan başka bir çalışmada, juvenil periodontitisi olan hastalarda yeterli supragingival plak kontrolü olan bölgelerden çekilen dişlerde ataçman kaybı olmadığı görülmüş ve bu bölgelerde subgingival plak da tespit edilmemiştir (Waerhaug, 1977). Bu çalışmanın önemli ve agresif periodontitisteki klinik tabloyla uyumlu bulgularından birisi bu hastalarda subgingival plağın çok ince olmasıdır. Bu çalışmada yıkımın olduğu bölgede

subgingival plak histolojik olarak tespit edilmesine rağmen, klinik muayene sırasında herhangi bir plak görülmemiş ve periodontal aletle yapılan taramada da alete herhangi bir plak gelmemiştir.

Mikrobiyal dental plak hastalığın başlaması için gereklidir, ancak agresif periodontitiste konak cevabının etkisi kronik periodontitise göre daha şiddetlidir. Bireyin genetik yapısı gibi konak cevabını etkileyen faktörler hastalığın ayırıcı özelliklerinden biri olan erken yerleşimli olmasından sorumludur. (Albandar, 2014; Loos ve ark., 2015). Günümüzde hem kronik hem agresif periodontitisin patogenezinde genetik faktörlerin rol oynadığı kabul görmüştür (ExpertView, 2017). Ancak agresif periodontitisin aynı aileden bireyler arasında sık görülmesi (familial agregasyon), başlangıç yaşının erken olması, hızlı ataçman kaybı gibi özellikleri genetik faktörlerin hastalığa yatkınlıkta daha büyük rol oynadığını göstermektedir (Hart ve ark., 1997; Laine ve ark., 2014; Loos ve ark., 2015). Başka bir deyişle kronik periodontitiste agresif periodontitise göre çevresel faktörlerin hastalığa yatkınlıkta ya da şiddetinde rolü daha büyükken genlerin rolü nispeten daha azdır. Diğer kompleks inflamatuvar hastalıklara benzer şekilde hastalık ne kadar erken yaşta açığa çıkarsa genetik komponenti de o kadar büyüktür. Nitekim, agresif periodontitisin sık görüldüğü aileler ve ikizler üzerinde yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, agresif periodontitiste genetiğin hastalığın oluşumundaki katkısının %50 olduğu tahmin edilmekte iken kronik periodontitiste bu oranın %25 olduğu tahmin edilmektedir (ExpertView, 2017).

Kronik periodontitiste ilk immün yanıt, periodontopatojen bakteriler tarafından gingival sulkus kolonizasyonunu takiben oluşur. Bakterilerin varlığı, gingival epitel tarafından sitokinlerin ve kemokinlerin üretimine neden olur. Bu, adezyon moleküllerinin ekspresyonu, diş eti kılcal damarlarının geçirgenliğinin artması ve polimorfonükleer nötrofillerin kemotaksisi ile birleşim epitelinden gingival sulkusa göçüne yol açar. Bu ilk yanıtın ürettiği spesifik sitokinler ve kemokinler, bağ dokusunda perivasküler T hücresi/makrofajın baskın olduğu inflamatuvar infiltrasyona yol açar. Bu hücre aracılı bağışıklık tepkisi bakteriyel tehdidi kontrol etmezse, bir B hücresi-plazma hücresi lezyonuna ilerleme meydana gelir. Daha sonra üretilen

antikorlar koruyucu olabilir ve enfeksiyonu kontrol edebilir ya da bağ dokusu yıkımı ve kemik kaybı ile sonuçlanabilir. Bu cevabın etkinliği bireyler arasında değişir ve hastalığa yatkınlığın belirlenmesinde oldukça önemlidir. (Gemmell ve ark., 2002; Gemmell ve ark., 2007).

Ancak şu anda, lokalize veya generalize agresif periodontitisin kronik periodontitisin tipik döngüsel seyrini izlediğine dair çok az kanıt vardır. Ek olarak, agresif periodontitiste, özellikle lokalize formunda sıklıkla klinik olarak gingival lezyon bulunmadığı için kronik periodontitisten farklı görünmektedir, bu da agresif periodontitis lezyonunun kronik periodontitis ile aynı başlangıç ve progresyon sırasını izlemeyebileceğini düşündürmektedir. Agresif periodontitis lezyonunun gelişimindeki aşamalar bilinmemekle birlikte, tam olarak gelişmiş lezyon bağ dokusunda plazma hücrelerinden baskın inflamatuvar infiltratla karakterize edilir, nötrofiller cep epitelinden sulkusa göç eder ve periodontal dokular ile biyofilm tabakası arasında bir hat oluşturur (Smith ve ark., 2010). Bu profil, kronik periodontitis histopatolojisi ile aynı olmasına rağmen, mutlaka farklı hastalıklar olmadığı anlamına gelmez (Smith ve ark., 2010).

Nötrofiller, doğal bağışıklık yanıtını oluşturmak ve modüle etmek için gereklidir; hızlı ve verimli bir şekilde mobilize edilebilirler ve patojenlere karşı ilk savunma hattını oluştururlar. Periodonsiyumdaki nötrofil aracılı doku hasarı ilk olarak Deguchi ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (Deguchi ve ark., 1990). Bulguları, LPS aktive normal insan nötrofillerinin, fibroblastlara yapışmasının arttığını ve insan periodontal ligament fibroblastlarının hasarına yol açtığını göstermiştir. Nötrofil ve gingival epitel hücre etkileşimlerinin analizine dayalı olarak benzer bulgular bildirilmiştir (Altman ve ark., 1992). Bu çalışma, insan nötrofillerinin ve ürünlerinin in vitro bir modelde epitel hücrelerini parçalama kapasitesine sahip olduğunu ve bu etkiye miyeloperoksidaz-hidrojen peroksit aracılığıyla yaptığını göstermiştir. Shapira ve ark., konağın periodontal dokuları üzerindeki nötrofillerin bu doğrudan zararlı aktivitelerine ek olarak, süperoksit oluşumunun hem istirahatte hem de uyarılmış agresif periodontitis nötrofillerinde arttığını göstermiştir (Shapira ve ark., 1991). Başka bir deney setinde, *P. gingivalis*'ten ekstrakte edilen lipopolisakkarid (LPS) ile hızlı ilerleyen periodontitis (HİP) hastalarından elde edilen nötrofillerin ön inkübasyonunun,

nötrofilleri, doza bağı bir şekilde süperoksit üretimini arttırmak için hazırladığı gösterilmiştir. Ayrıca, HİP hastalarından alınan serum örneklerinde P. gingivalis LPS'lerinin kontrol nötrofillerine göre daha yüksek bir yanıt oluşturduğu gösterilmiştir.

Bozulmuş nötrofil fonksiyonunun en iyi karakterize edildiği periodontal hastalık lokalize agresif periodontitistir (LAgP). Polimorfonükleer lökosit (PMNL = nötrofil) bir anahtar hücre tipidir ve konağın inflamatuvar yanıtının önemli bir parçasıdır. Koruyucu işlevleri, periodontal hastalığın patogenezi ile ilgili olarak kapsamlı bir şekilde çalışılmış ve birkaç hipotez öne sürülmüştür. Yakın zamana kadar, nötrofil işlevleriyle ilişkili kusurların enfeksiyona yatkınlığı arttırdığına inanılıyordu. Bununla birlikte, bu varsayımın geçerli olmayabileceğini ima eden artan bir veri kitlesi mevcuttur. Bu yeni paradigma altında, PMNL'nin "hipofonksiyonel" veya "eksik" değil, "hiperfonksiyonel" olduğu ve kısmen kronik periodontal doku tahribatından sorumlu olan inflamatuvar ürünlerin aşırı aktivitesi ve salınmasına neden olduğu vurgulanmaktadır (Kantarcı, 2003).

Doğal bağışıklık sistemi, istilacı mikroorganizmaları, toll benzeri reseptörler (TLR) gibi örüntü tanıma reseptörleri (ÖTR) aracılığıyla patojenle ilişkili moleküler modelleri sayesinde algılar. Şimdiye kadar tanımlanan 10 insan TLR'ü arasında, TLR-2 ve TLR-4 periodontal hastalıkta en çok tanımlanan üyelerdir (Takeda ve ark., 2003). TLR-2, çoğunlukla peptidoglikan ve lipoproteinler gibi çeşitli farklı bakteri hücre bileşenlerinin tanınmasında rol oynar (Liu ve ark., 2001). TLR-4'ün Gram-negatif bakterilerin LPS'lerini spesifik olarak tanıdığı ve LPS bağlayıcı protein ve CD14 gibi çeşitli protein bileşenleri ile iş birliği içinde hareket ettiği gösterilmiştir (Yoshimura ve ark., 2002). Son zamanlarda, birkaç çalışma, TLR-4'teki ve TLR-2'deki mutasyonların periodontal hastalıklarda endotoksine karşı verilen yetersiz yanıt ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, bu mutasyonları periodontal hastalıkla ilişkilendiren bulgular tutarsızdır. Bazı çalışmalarda, kronik periodontitis ile TLR-2 ve TLR-4'teki mutasyonlar arasında bir ilişki bulunamazken (Folwaczny ve ark., 2004; Laine ve ark., 2005), bir çalışma TLR-4 mutasyonu ile sadece kronik periodontitis arasında güçlü bir ilişki olduğunu, buna karşın TLR-2 mutasyonları ile kronik

periodontitis ve agresif periodontitis arasında hiçbir ilişki olmadığını bildirmiştir (Schroder ve ark., 2005).

1.2.Periodontal Hastalık ve Durumların Sınıflandırması- 2017 Sınıflandırması

1999 sınıflandırması, 17 yıl boyunca periodontolojide hem klinik uygulamada hem de bilimsel araştırmada yaygın olarak kullanılan uygulanabilir bir çerçeve sağlamış olsa da, sistem; önemli ölçüde örtüşme ve öngörülen kategoriler arasında patobiyolojiye dayalı net ayrımın olmaması, teşhis belirsizliği ve uygulama zorlukları dahil olmak üzere birçok önemli eksikliklere sahip bulundu. Bu nedenle 2017 yılında, Amerikan Periodontoloji Akademisi ve Avrupa Periodontoloji Federasyonu tarafından, periodontitisin mevcut sınıflandırma sistemini yeniden gözden geçirerek, epidemiyolojisi, etiyojisi ve patogenezi ile ilgili mevcut sınıflandırmanın başlangıcından bu yana biriken yeni bilgilerin dahil edildiği ve vaka tanımlarının yer aldığı yeni bir sınıflama sistemi geliştirilmiştir (Papapanou ve ark., 2018). Bu yeni sınıflama sisteminde daha önce "kronik" ve "agresif" olarak tanınan hastalık formlarının artık tek bir kategori (periodontitis) altında gruplandırıldığı ve ayrıca çok boyutlu bir evreleme ve derecelendirmeye dayalı olarak karakterize edildiği yeni periodontitis sınıflandırma şeması benimsenmiştir (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2. 2017 Periodontal hastalık ve durum sınıflaması

PERIODONTAL HASTALIK VE DURUMLAR										
Periodontal Sağlık, Gingival Hastalık ve Durumlar			Periodontitis			Periodonsiyumu Etkileyen Diğer Durumlar				
Periodontal sağlık ve gingival sağlık	Gingivitis: Dental biyofilm kaynaklı	Gingival hastalıklar: Dental biyofilm kaynaklı olmayan	Nekrotizan periodontal hastalıklar	Periodontitis	Sistemik hastalıkların bir bulgusu olarak periodontitis	Periodontal dokuları etkileyen sistemik hastalık ve durumlar	Periodontal apseler ve endodontik-periodontal lezyonlar	Mukogingival deforme ve durumlar	Travmatik oklüzal kuvvetler	Diş ve protez ilişkili faktörler

Evreleme, büyük ölçüde hastalığın o andaki şiddetine ve hastalık yönetiminin karmaşıklığına bağlıyken (Çizelge 1.3) derecelendirme, periodontitis ilerleme hızının geçmişe dayalı bir analizi dahil olmak üzere hastalığın biyolojik özellikleri, ilerleme için riskin değerlendirilmesi, tedavinin olası kötü sonuçlarının analizi, hastalığın veya

tedavisinin hastanın genel sağlığını olumsuz etkileme riskinin değerlendirilmesi gibi konularda ek bilgi sağlar (Çizelge 1.4).

2017 sınıflamasında da 1999 sınıflamasında olduğu gibi inflamasyona bağlı periodontal doku kaybı, periodontitisin birincil özelliğidir. Klinik ataçman kaybı, radyografik olarak değerlendirilen alveolar kemik kaybı, periodontal cep oluşumu ve kanama varlığı tanı kriterlerini oluşturur (Çizelge 1.3 ve Çizelge 1.4). Birbirine komşu olmayan en az 2 dişte 2 mm ve üzerine interproksimal klinik ataçman kaybı veya 2’den fazla dişte bukkal veya lingualde 3 mm ve üzeri sondalamada cep derinliği ve 3 mm ve üzeri klinik ataçman kaybı esas kriter olarak kabul edilir ve radyografik olarak saptanabilir kemik kaybının klinik ataçman kaybını desteklemesi gerekir.

Çizelge 1.3. Periodontitis: Evreleme

	Periodontitis	Evre I	Evre II	Evre III	Evre IV
Şiddet	Interdental KAK(en fazla kaybın görüldüğü bölge)	1-2 mm	3-4 mm	≥5mm	≥5mm
	RKK	Koronal üçlü (<%15)	Koronal üçlü (%15-%33)	Kökün orta üçlüsü veya ilersine uzanan	Kökün orta üçlüsü veya ilersine uzanan
	Diş kaybı (periodontitise bağlı)	Diş kaybı yok	Diş kaybı yok	≤4 diş	≤5 diş
Komplekslik/Karmaşıklık	Lokal	- CD≤4mm - Genellikle horizontal kemik kaybı	- CD≤5mm - Genellikle horizontal kemik kaybı	Derece II karmaşıklığa ilaveten; - CD≥6mm - Vertikal kemik kaybı≥3mm - Sınıf II veya III furkasyon problemi - Orta dereceli kenar defektleri	Derece III karmaşıklığa ilaveten; - Kompleks tedavi gerektiren - Çiğneme fonksiyon bozukluğu - Sekonder oklüzal travma (diş mobilite derecesi≥2) - Şiddetli kenar defekti - bite collapse, drifting, flaring <20 diş varlığı (karşılıklı 10 tane)
Kapsam ve dağılım	Tanımlayıcı olarak dereceye ekle	Bütün dereceler için; Lokalize (<%30 diş etkilenmiş) Generalize Molar- keser tutulumu			

Çizelge 1.4. Periodontitis: Derecelendirme

	İlerleme		Derece A: Yavaş ilerleme	Derece B: Orta hızda ilerleme	Derece C: Hızlı ilerleme
Primer kriter Mümkün olduğunda doğrudan kanıtlar kullanılmalı	İlerlemenin doğrudan kanıtları	Radyografik kemik kaybı veya KAK	5 yılda hiç kemik kaybı gözlenmemesi	5 yılda <2mm kemik kaybı	5 yılda ≥2mm kemik kaybı
	İlerlemenin dolaylı kanıtları	% kemik kaybı/yaş	<0.25	0.25 ile 1 arasında	>1
	Vaka fenotipi		Yüksek miktarda biyofilm birikimi düşük seviyede doku harabiyeti	Biyofilm miktarı ile uyumlu doku harabiyeti	Biyofilm miktarına oranla aşırı doku harabiyeti, hızlı ilerleme dönemlerinin ve/veya erken hastalık başlangıcının klinik tablo
Derece modifikasyon faktörleri	Risk faktörleri	Sigara	Sigara kullanmıyor	<10 sigara/gün	≥10 sigara/gün
		Diabet	Normoglisemik/diabet tanısı konulmamış	Diabet tanısı konulan hastalarda HbA1c değeri <%7	Diabet tanısı konulan hastalarda HbA1c değeri ≥%7

1.3.Periodontitis Patogenezi

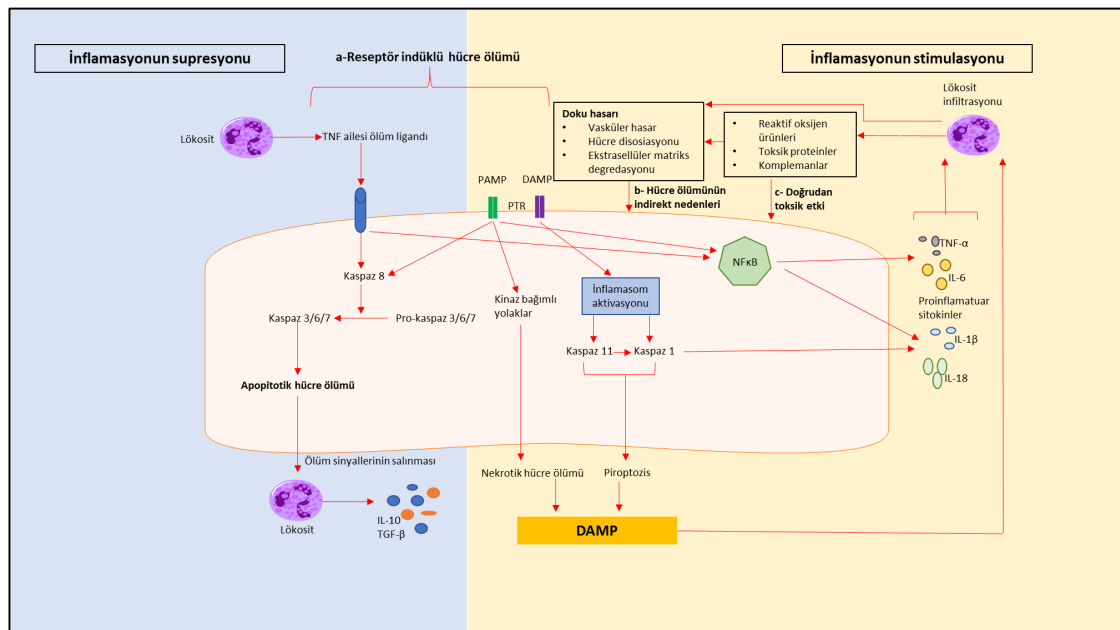
Başlıca oral hastalıklardan biri olan periodontitis; periodontal ligament harabiyeti, ataçman kaybı ve alveolar kemik rezorpsiyonu ile karakterizedir. Periodontitis dünya çapında birçok insanı etkiler ve diş kaybının ana nedenidir; oysa patogenezi oldukça karmaşıktır. Genel olarak; *P. gingivitis* (Byrne ve ark., 2009), *A.a. (Aggregatibacter actinomycetemcomitans)* (Fine ve ark., 2007), *T. forsythia* (Tomita ve ark., 2013), *F. nucleatum*, *T. denticola* (Shin ve ark., 2013) ve *A. viscosus* (Shimada ve ark., 2012) ön planda olmak üzere dental plakta bulunan periodontal patojenler tarafından başlatılan inflamatuvar bir hastalıktır. Bununla birlikte sigara kullanımı (Kamma ve ark., 2004), oklüzal travma (Nakatsu ve ark., 2014), ağız solunumu (Seo ve ark., 2013), genetik faktörler (Laine ve ark., 2012), hormonlar (Antonoglou ve ark., 2015) ve stres (Huang ve ark., 2011) periodontitisin ilerlemesini destekleyebilir. Ek olarak, diyabetes mellitus (DM) (Preshaw ve ark., 2012), romatoid artrit (RA) (Dissick ve ark., 2010), obezite (Boesing ve ark., 2009) ve ateroskleroz (Buhlin ve ark., 2009) gibi bazı sistemik hastalıklar, yine sistemik hastalıklar için bir risk faktörü olan periodontiti alevlendirebilir (Gurav ve Jadhav, 2011 ve Watanabe ve ark., 2008) . Genel olarak, oldukça yaygın bir oral hastalık olarak periodontitis, çoklu patojenik faktörlerin bir sonucu olarak gelişir. Tedavi edilmediği takdirde sert ve yumuşak doku yıkımına yol açan esas mekanizma inflamatuvar hücre yanıtıdır (Van Dyke ve Serhan, 2003). Ancak, periodontal patojenlerin ve risk faktörlerinin periodonsiyumu tahrip ettiği moleküler mekanizmalar henüz tam olarak açıklığa kavuşmamıştır.

Doku hasar mekanizmaları inflamasyonla ilişkili araştırmaların başından beri hücre bazda yürütülmesine rağmen son dönemde ilgi tek tek hücre ölümüne kaymıştır. Hastalıkların hücrelerdeki temel değişikliklere kadar takip edilebileceği fikrini tanıtan Rudolf Virchow, muhtemelen inflamasyon ile yaralanan dokularda hücrelerin patolojik değişikliklere uğradığını fark eden ilk kişiydi (Virchow, 1863). Bu ilk keşiflerin ardından, inflamatuvar lezyonlarda hücre ölümü olgusu birçok çalışmada ele alınmıştır. Beklenmedik bir şekilde, dokularda ciddi yaralanmalara büyük ölçekli hücre ölümünün eşlik ettiği gözlenmiştir. İnflamasyon sırasında hücre ölümünün başlangıçta doku hasarının bir tezahürü olduğu düşünülse de, daha sonra

patojenlerin ortadan kaldırılması için bir mekanizma olduğu fikri gündeme gelmiştir. O zamandan bu yana hücre ölümünün; hücresel bileşenleri veya diğer hücrelerin işlevlerini değiştiren benzersiz türevlerini ortaya çıkararak inflamasyonu düzenlemek gibi daha ince bir rolü olduğu gösterilmiştir (Kajstura ve ark., 1996 ve McCully ve ark., 2004).

Martin Raff tarafından tanımlandığı gibi, hücrenin hayatta kalması “sosyal” olarak kontrol edilir (Raff, 1992). Bu nedenle, normalde çevreleyen hücreler ve hücre dışı matris tarafından sağlanan hayatta kalma sinyallerinin yetersizliğinin bir sonucu olarak hücre ölümü meydana gelebilir. Ayrıca açlık, dysoxia, pH değişikliği, iskemi-reperfüzyon hasarı ve diğer dolaylı mekanizmalar ölüme yol açabilir. İnflamasyonda doku hasarına katkıda bulunan bileşikler ve mekanizmalar bu nedenle dolaylı olarak hücre ölümünü de tetikleyebilir.

Lökositler tarafından üretilen bazı bileşiklerin doğrudan hücre ölümünü indüklediği gösterilmiştir. Lökositlerin kompleman proteinleri (Kalfayan ve Kidd, 1953), katyonik proteinler (Clark ve ark., 1976) ve reaktif oksijen türleri ile hücreler üzerinde doğrudan toksik etki göstererek ve dolaylı olarak hücre içi hasar mekanizmalarını tetiklediği ve hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Hücre ölümünün doğrudan ve dolaylı nedenleri

Ökaryotik hücrelerin hücre ölümüne uğradığı iki ayrı yol mevcuttur ve nekroz ve programlanmış hücre ölümü (PHÖ) olarak tanımlanır (Kerr ve ark., 1972). Nekroz, hücre zarının travmaya maruz kalması veya fiziksel yaralanma gibi doğrudan ve/veya dolaylı hasar ile indüklenebilir. PHÖ ise, konak hücre sayısının korunması için esastır. Nekrozdaki farklı olarak PHÖ bir dizi gen ekspresyon olayının aracılık ettiği aktif bir hücre ölümüdür (Föller ve ark., 2008). PHÖ apoptoz, otofaji, programlanmış nekroz (nekropitoz) ve piropitoz olarak sınıflandırılabilir (Capon ve ark., 2013; Shalini ve ark., 2015). Başlangıçta hücre ölümünün inflamasyon sonucu olduğu düşünülse de, daha yakın zamanda hücre ölümünün, inflamatuvar yanıtın önüne geçebileceği, tetikleyebileceği veya şiddetlendirebileceği kavramı giderek daha fazla ilgi görmüştür (Wallach ve ark., 2014). Son çalışmalar PHÖ'nün inflamatuvar yanıtta yer aldığını göstermektedir ancak (Deretic ve ark., 2015 ve Wang ve ark., 2016) periodontitisteki rolü belirsizliğini korumaktadır.

Apoptoz, ilk ve en kapsamlı olarak incelenen PHÖ türüdür. Programlanmış "kendini öldürme" olarak tanımlanabilir (Maiuri ve ark., 2007). Apoptoz, sağlıklı hücrelerin yenilenmesinde ve yaralı hücrelerin ortadan kaldırılmasında önemli bir rol oynar. Düzensiz apoptoz, doku hasarına neden olarak organ fonksiyon bozukluğuna yol açar. İnsan sağlığı ve hastalıkları hücre apoptozu ile düzenlenebilir (Elmore, 2007). Apoptoza, kaspaz bağımlı yollar aracılık eder (Şekil 1.1)(Fan ve ark., 2005). Tipik olarak, apoptoz; hücre membranında çıkıntı oluşması, DNA parçalanması ve kaspaz aktivasyonu ile karakterizedir.

Kaspazlar, immün hücreler ve immün olmayan hücreler tarafından birçok doku ve organda eksprese edilir. Kaspazların bağışıklık sisteminde çok yönlü rolleri vardır. Hücre ölümüne ve inflamasyona aracılık eden çeşitli ve dinamik kompleksler oluştururlar. İnflamatuvar kaspazlar; kaspaz 1, kaspaz 4, kaspaz 5 ve kaspaz 11, IL-1 β ve IL-18'in inflamasyonla ilişkili sekresyonuna aracılık eder ve piropitozu başlatır. Apoptotik kaspaz 8, nükleer faktör- κ B (NF- κ B) sinyalizasyonunu modüle ederek inflamasyonun başlamasına katkıda bulunur ve pro-IL-1 β ve pro-IL-18'in doğrudan veya dolaylı aktivasyonunu teşvik eder, ancak aynı zamanda inflamatuvar yanıtların

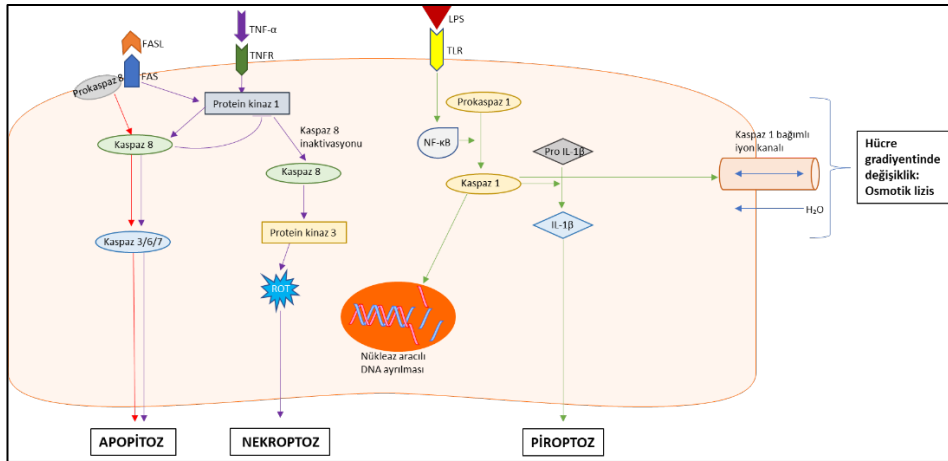
aktivasyonundan sorumlu olan inflamasyonun etkinliğini, ve nekroptozu bloke ederek inflamasyonun inhibisyonunda da rol oynar (Kang ve ark., 2013).

Birkaç çalışma, periodontal hastalıkta apoptozisin rolünü araştırmıştır (Akgul ve ark., 2001; Lee ve ark., 1993; Mangan ve ark., 1993 ve Murray ve Wilton, 2003). Bantel ve ark yaptıkları çalışmada periodontitisli deneklerin dişeti dokularında kaspaz-3 ve kaspaz-7 aktivitelerinin arttığını ortaya çıkarmıştır (Bantel ve ark., 2005), bu da periodontitiste apoptozun artmış tutulumuna işaret etmektedir ve inflame dişeti dokuları periodontal patojenlere daha duyarlıdır. Kurita-Ochiai ve arkadaşları (2008), periodontitisli hastalardan izole edilen iltihaplı insan gingival fibroblastlarında (İGF'lar) apoptotik hücrelerin oranının arttığını ve mitokondriyal membran potansiyelinin azaldığını bildirmişlerdir. Bazı çalışmalarda ise bakteriyel ürünlerin apoptozu indüklediği ve inflamatuvar hücrelerin ömrünü uzattığı gösterilmiştir (Akgul ve ark., 2001; Lee ve ark., 1993; Mangan ve ark., 1993 ve Murray ve Wilton, 2003). Bu bakteriyel ürünler nötrofillerin yaşam süresini uzatma yeteneğinde olabilir, artan ve uzun süreli inflamasyona ve çevre dokuda hasara neden olabilir. Bu yetenek, diş eti epitelinden kemokin ve sitokin salınımının yanı sıra hücre adezyon moleküllerinin ekspresyonunu indükleyebildiği ve böylece nötrofilleri toplayabildiği bulgusuyla daha da vurgulanmaktadır (Sugiyama ve ark., 2002 ve Wang ve ark., 1998). Bu bulgular, bakteriyel ürünlerin yıkıcı periodontal hastalığın başlaması ve alevlenmesindeki rolünü desteklemektedir. Kanıtlar, apoptoz ve nekrozun kronik inflamatuvar sürecin gelişiminde önemli bir rol oynayabileceğini ve periodontitiste doku yıkımı ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (Abuhussein ve ark., 2014; Bantel ve ark., 2005 ve Tunalı ve ark., 2014). Klinik olarak sağlıklı dişetinde, özellikle junctional epitelde homeostazın korunması, mukozal inflamasyonun düzenlenmesinde rol oynayabilen bir fenomen olarak apoptozlar görülmekle birlikte, derin periodontal cepte gözlenen azalmış proliferasyon ve artmış apoptozun periodontitisin ilerlemesinde önemli bir faktör olabileceği düşünülmektedir (Jarnbring ve ark., 2002; Tonetti ve ark., 1998). Kronik periodontitis hastalarında apoptoz ilişkili gen ekspresyonunu değerlendirmek amacıyla yapılan çalışmalarda, hem gingival dokularda (Lundmark ve ark., 2015) hem de periferik kan monositlerinde (Liu ve ark., 2016) ilgili genlerin ekspresyonlarının arttığı gösterilmiştir. Periodontopatojenler, hücre apoptozu ve nekrozu ile birlikte

oluşan bağışıklık sisteminin aktivasyonu ile ilişkili bulunmuşlardır (Kelk ve ark., 2011; Leung ve ark., 2002 ve Uitto ve ark., 1995).

Nekropitoz, 'programlanmış nekroz' olarak adlandırılabilir. Bir ölüm reseptörünün aktivasyonundan alınan uyarılarla başlatılır (Şekil 1.2). Reseptör etkileşimi sıklıkla protein kinaz 1 ve 3 üzerinden gelişir (Linkermann ve Green, 2014 ve Wu ve ark., 2012). Piropitoz başka bir PHÖ türüdür ve tipik olarak kaspaz-1'e bağlı sinyal yolu ile düzenlenir (Şekil 1.2). Bununla birlikte, kaspaz-1 apopitozda yer almaz (Fink ve Cookson 2006).

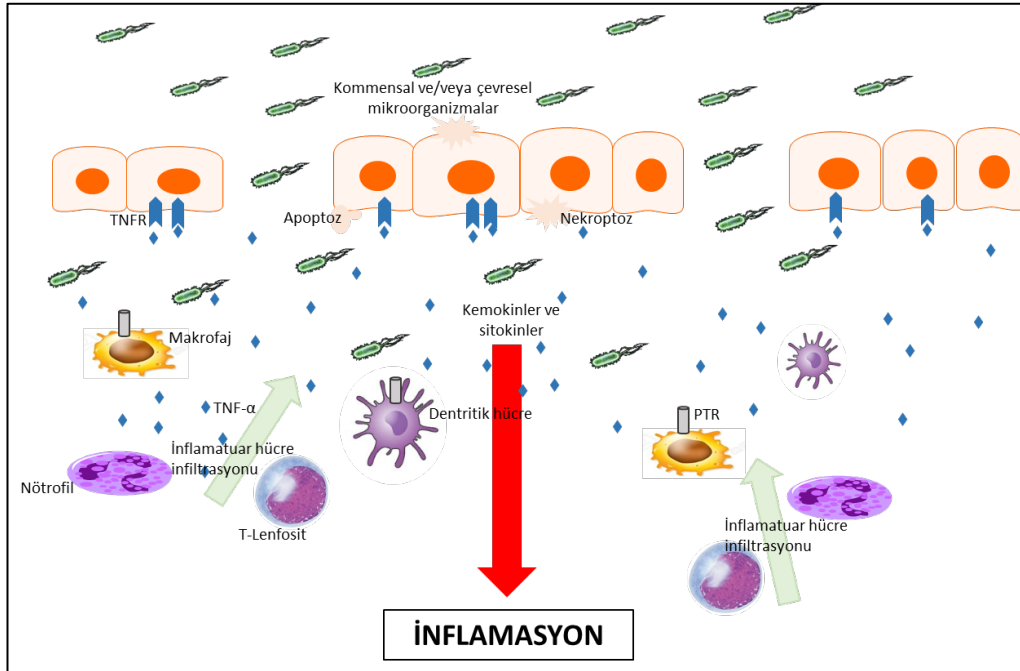
Nekropitoz veya piropitozun periodontitiste yer alıp almadığı bilinmemektedir. Bununla birlikte, bazı çalışmalarla birkaç ipucu verilmiştir. Yaşamsal bir patolojik mekanizma olarak oksidatif stres (OS), nekropitoz / piropitoz ve periodontitis arasındaki ilişkiye biraz ışık tutabilir. OS, periodontitiste rol oynamaktadır (Akalın ve ark., 2007 ve Tsai ve ark., 2005) ve OS tarafından nekropitoz ve piropitoz başlatılabilir (Jang ve ark., 2015 ve Pacheco ve ark., 2014).



Şekil 1.2. Hücre ölümü ve ilişkili hücre içi sinyal yolları

1.3.1. Programlanmış Hücre Ölümü-İnflamasyon İlişkisi

Hücre ölümü, inflamatuvar yanıt aracılığıyla epitel bariyerlerin bütünlüğünü bozarak dolaylı olarak inflamasyonu tetikleyebilir (Şekil 1.3). Bu özellikle lümen bakterileri ve mukozal bağışıklık sistemi arasında bir bariyer sağlayan bağırsak epitelinde ve gingival epitelde önemlidir. Farklı fare modellerinde, bağırsak epitel hücrelerinin (BEH) ölümünün genellikle bağırsak inflamasyonunu tetiklediği gösterilmiştir ancak burada apoptoz ve nekropitozun inflamasyonu indüklemeye kapasitelerinde farklılık gösterip göstermediği belirsizdir. Bariyerin bütünlüğü, sadece hücre ölümüne değil aynı zamanda kalan hücrelerin bariyeri proliferasyon ve kapalı tutma kapasitesine de bağlıdır. Bu nedenle nekropitoz ve apoptozun; proliferasyon, göç ve yapışma gibi komşu epitelyal hücrelerin bariyer ile ilgili temel özelliklerini farklı şekilde düzenleyip düzenlemediği incelenmeye muhtaç konular arasındadır (Paparakis ve Vandenabeele, 2015).

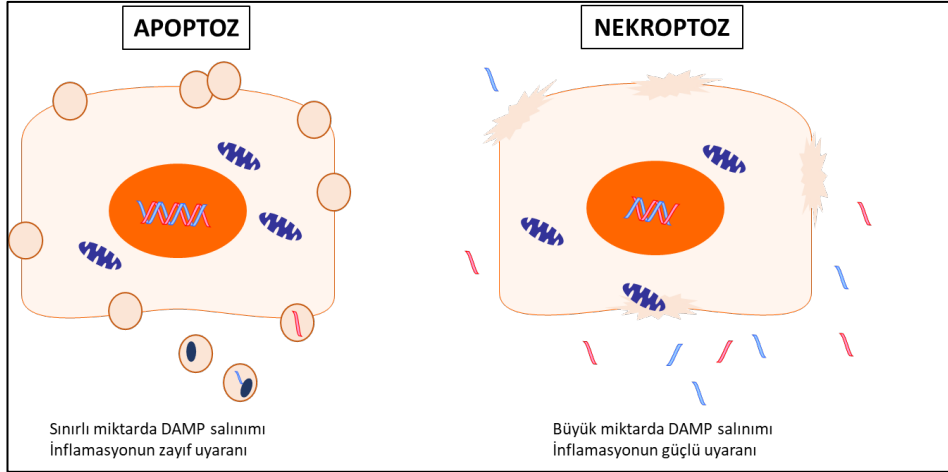


Şekil 1.3. Düzenlenmiş hücre ölümünün inflamasyon ile ilişkisi.

İnflamasyon bölgesindeki tüm organ veya organizma yerine tek tek hücrelerin feda edilmesi inflamatuvar cevabın yönetimi açısından önemli bir fizyolojik tepkidir. Bu nedenle hücre ölümünün inflamasyonun önemli fizyolojik mekanizmalarından biri olduğu düşünülmektedir. Farklı hücre ölümü biçimleri bu rolü çeşitli şekillerde yerine getirebilir. Apoptotik hücreler makrofajlar tarafından bozulmadan alındıklarından, onları enfekte eden patojenler de büyük olasılıkla alınır ve onları barındıran ölmekte olan hücre ile birlikte makrofaj içinde yok edilir. Bunun tersine, nekrotik veya piroptotik hücre ölümü sırasında, bağışıklık tepkisinden saklı kalabilecek olan patojenler, ölmekte olan hücrelerin zarlarının yırtılmasıyla açığa çıkar. Bu zar yırtılmasının, bu patojenlerin hücre dışı yıkımını kolaylaştırması muhtemeldir, çünkü nekrotik hücrelerden salınan hücresel bileşenler inflamasyonu tetikler. Piroptoz durumunda, bu inflamasyon, IL-1 β ve IL-18'in kaspaz 1 aracılı oluşumu ile daha da kolaylaştırılır (von Moltke ve ark., 2013 ve Zychlinsky ve ark., 1994).

Matzinger, stresli ve yaralı hücreler tarafından üretilen faktörlerin immüno-düzenleyici rollerine dikkat çekmiş ve bunların adaptif bağışıklığı da desteklediklerini öne sürmüştür (Matzinger, 1994).

Steril bir ortamda, ölmekte olan hücreler topluca hasara bağlı moleküler paternler (DAMP) olarak tanımlanan faktörleri serbest bırakarak inflamasyonu doğrudan tetikleyebilir. Apoptozun genellikle immünojenik olmadığı düşünülmektedir, çünkü apoptotik hücrelerin düzenli bir şekilde ayrılması, DAMP salımını engellemekte ya da sınırlandırmaktadır (Şekil 1.4.). Bununla birlikte, nekroptoz ile birlikte parçalanan hücreden büyük miktarda DAMP salındığı ve inflamasyonu doğrudan tetiklediği konusunda genel bir fikir birliği vardır (Kaczmarek ve ark., 2013) (Şekil 1.4.). DAMP'ın periodontitis patogeneziindeki etkinliğine dair kısıtlı bilgiler olmakla birlikte inflamasyonu fibroblastlar üzerinden etkilediğine dair veriler mevcuttur.



Şekil 1.4. Ölmekte olan hücrelerden DAMP salınımı

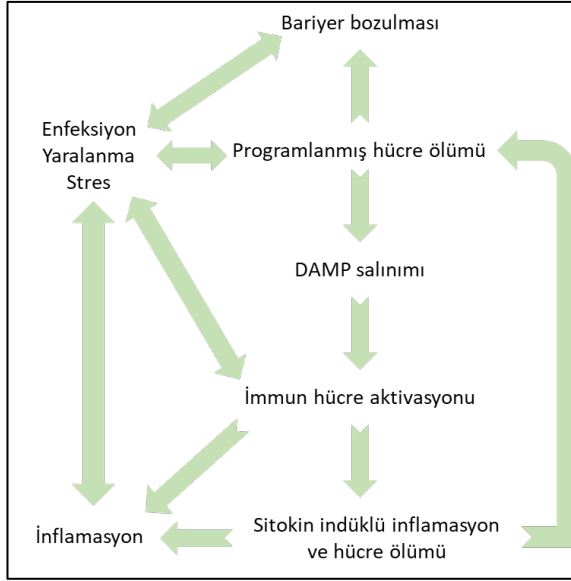
1.3.2. Hasarla İlişkili Moleküler Paternler (DAMP)

DAMP'lar ölmekte olan, yaralanmış veya stres altında kalmış hücreler tarafından salgılanan veya açığa çıkan ve bağışıklık sistemini uyarmak için tehlike sinyalleri görevi gören molekülleri ve hücresel bileşenleri toplu olarak tarif eder ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı, ateroskleroz, tip 2 DM ve RA dahil olmak üzere kronik ve metabolik hastalıklarda rol oynadıkları gösterilmiştir. (Brusselle ve ark., 2011; Robbins ve ark., 2014 ve Schett ve ar., 1998). DAMP'lar, esas olarak IL-1 ailesinden IL-1 α ve IL-33 gibi ölmekte olan hücreler tarafından salınan sitokinler ve alarminlerin yanı sıra S100A8, S100A9 ve S100A12 proteinlerini içerir. Ek olarak, normalde önemli ve baskın olarak immünolojik olmayan işlevleri yerine getiren hücrenin içinde bulunan birkaç hücresel bileşen, sadece DAMP olarak işlev görmek üzere, ölmekte olan veya hasar görmüş hücreler tarafından salınır. Bunlar arasında nükleik asitler ve ribonükleoproteinler, histonlar ve HMGB ailesi üyeleri, ısı şok proteinleri, mitokondriyal N-formil peptitleri ve DNA veya hatta bozulmamış mitokondri, F-aktin, kalretisin, aynı zamanda monosodyum urat ve ATP gibi moleküller sayılabilir (Krysko ve ark., 2012). Bu endojen moleküller, konak tarafından üretilmiş mikrobik olmayan uyarılar olarak işlev görür ve patojenle ilişkili moleküler paternlere (PAMP'ler) benzer inflamatuvar tepkileri indükler (Chen ve Nuñez, 2010). DAMP'ler ve PAMP'ler genellikle, sitokinlerin ve kemokinlerin ekspresyonunu indükleyerek bağışıklık yanıtlarını aktive eden ÖTR tarafından tespit edilir. DAMP'lerin öncelikle nekroz

geçiren hücreler tarafından serbest bırakıldığı bildirilmekle birlikte, apoptotik hücrelerin de yakın zamanda DAMP'leri açığa çıkardığı veya serbest bıraktığı gösterilmiştir (Wickman ve ark., 2013).

Farelerde yapılan çalışmalar, nekropitozun hastalık patogenezinde önemli bir role sahip olduğunu gösteren güçlü kanıtlar sağlamıştır. Bir başlatma sinyali olarak hareket etmenin yanı sıra, düzenlenmiş hücre ölümü ve inflamatuvar yanıt sırasında üretilen birçok sitokin (TNF ailesi üyeleri veya INF'ler gibi) güçlü hücre ölümü indükleyicileri olduğundan, inflamasyonun amplifikasyonuna ve kronikleşmesine katkıda bulunabilir. Hücre ölümü, DAMP salınımı, bağışıklık hücresi aktivasyonu ve ölüme neden olan sitokinlerin salınmasını içeren bu kısır döngü, uzun süreli çözülmeyen inflamatuvar yanıtları besleyebilir ve kronik inflamatuvar hastalıkların patogenezinde katkıda bulunabilir (Şekil 1.5.) (Pasparakis ve Vandenabeele, 2015).

Proinflamatuvar sitokinlerin ve DAMP'lerin nekrotik hücreler tarafından salınması apoptozu indükleyebilir ve apoptotik hücrelerin takiben artışı, bazı diğer inflamatuvar hastalıklarda bildirildiği gibi periodontitiste de ikincil nekroza yol açabilir (Al-Samadi ve ark., 2015 ve Qin ve ark., 2006). Bununla birlikte, apoptozun periodontitiste inflamasyon ve yıkıma nasıl neden olabileceği ile ilgili mekanizmalar belirsizliğini korumaktadır.



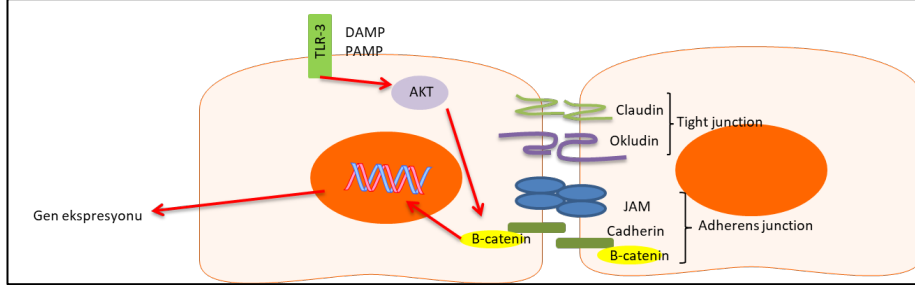
Şekil 1.5. PHÖ- inflamasyon ilişkisi.

1.3.3.Periodontitis Patogenezinde DAMP’ın Rolü

Periodontal patojenler, dokuyu istila ederek ve zararlı maddeler üreterek doğrudan büyük tahribatlara neden olabilir (Taichman 1989). TLR gibi ÖTR'leri yoluyla konak inflamatuvar hücreleri tarafından tanınan patojene bağlı moleküler paternler (PAMP) olarak bilinen bir dizi molekül, inflamatuvar yanıtları indükleyebilir ve bu yanıt doku yıkımına da katkıda bulunabilir. Periodontal patojenlere ek olarak, bazı hücre türevli moleküller de tehlike sinyali olarak reaksiyona girebilir ve inflamatuvar yanıtları aktive edebilir, hücre hasar sırasında proinflamatuvar sitokinler olarak hareket edebilir, ÖTR'leri aktive edebilir ve inflamatuvar yanıtı uyarabilirler (Tang ve ark., 2012).

Periodontitis lezyonlarında hasar görmüş ve nekrotik hücrelerden salınan endojen tehlike sinyal moleküllerinin periodontal hastalıkların immünopatogenezinde yer aldığı düşünülse de bunların periodontitis ile ilişkisi bilinmemektedir. DAMP'ler, insan gingival epitel hücreleri ve HGF'lar gibi periodontal hücreleri uyararak periodontal inflamasyonu başlatabilir veya şiddetlendirebilir. Mori ve ark. bu hipotezi test etmek amacıyla 2015 yılında yaptıkları çalışmada nekroz ile uyarılan TLR-3 aktivitesinin gingival hücreler üzerindeki etkilerini değerlendirmişlerdir (Mori ve ark.,

2015). Çalışma sonucunda dişeti epitel hücrelerinin ve fibroblastların hücre hasarının, TLR-3 yoluyla inflamatuvar yanıtları başlattığını, TLR-2 ekspresyonunu artırdığını ve bunun da kronik periodontal hastalığın nedensel mikroorganizmalarından biri olan *P. gingivalis*'in LPS'ine karşı inflamatuvar yanıtı arttırdığını bulmuşlardır. Bu çalışmada, dişeti epitel hücrelerinin ve fibroblastların, *P. gingivalis* LPS'nin bir ligandı olan TLR-2'nin ekspresyonunu arttırmak için DAMP'ları tanıdıklarını göstermişlerdir. Ek olarak, DAMP'lerin epitel hücrelerinde zonulaokludens-1 (ZO-1) ve okludin ekspresyonunu azalttığını ve epitelyal bariyer fonksiyonlarını bozduğu da gösterilmiştir. Royer ve ark. yaptıkları çalışmada TLR-3 aktivitesinin, epitel bariyerinin bozulmasına neden olduğunu göstermişlerdir (Royer ve ark., 2017). Rezaee ve ark. ise bu bozulmayla beraber adherens junctionlardan hücrelere β -katenin'in salındığını ve çekirdekte aktif β -katenin miktarının arttığını göstermişlerdir. (Rezaee ve ark., 2011). Bunun sonucunda çekirdeğe taşınan β -katenin ise çeşitli sitokinlerin salınımını, TLR-2/3 ve Wnt ekspresyonunu uyarır (şekil 1.6.) (Barker 2008).



Şekil 1.6. DAMP/PAMP-TLR etkileşimi

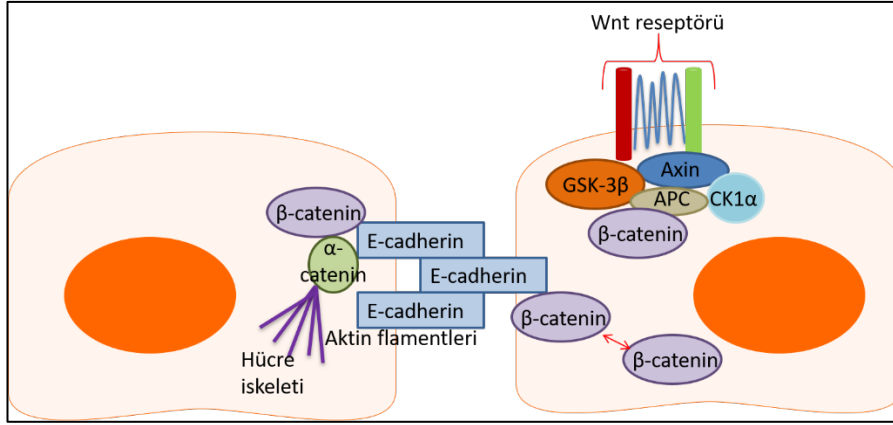
1.4.Wnt/ β -catenin Sinyal Yolu

Armadillo Protein Ailesi'nin bir üyesi olan β -catenin, Wnt / β -catenin sinyal yolunun ana hedefi ve temel bileşenidir. Bu yolak, hücre kaderini belirleme, polarite ve farklılaşma ile birçok organ ve dokuda göç, proliferasyon ve fonksiyona kadar büyüme ve gelişmenin çeşitli aşamalarında rol oynar (Moon ve ark., 2002; Visweswaran ve ark., 2015). Örneğin, embriyonik gelişim sırasında, Wnt / β -catenin vücut ekseninin oluşturulmasına ve doku ve organ gelişiminin düzenlenmesine kritik

katkıda bulunur. Gelişimden sonra, Wnt / β -catenin'in saç folikülü, bağırsak kript ve hematopoietik sistem gibi kendini yenileyen dokularda önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Patolojik koşullar altında, bu yolun aktivasyonu ile sonuçlanan değişiklikler, kolon kanseri, saç folikülü tümörleri ve lösemi gibi kanserlerde yaygın olarak görülür (Clevers 2006).

Catenin, beta 1 (β -catenin; Ctnnb1) ilk olarak 1980'lerin sonlarında Ozawa ve meslektaşları tarafından α -catenin ve γ -catenin ile birlikte adlandırılmış ve Ca^{2+} bağımlı hücre adezyonu yoluyla E-kadherini hücre iskeletine bağladığı bildirilmiştir (Şekil 1.7.) (Ozawa ve ark., 1989). Hem sitoplazmada hem de çekirdekte bulunabilen (McCrea ve ark., 1991) proteinin çeşitli transkripsiyon faktörleri ile Wnt aracılı transkripsiyonu tetiklediği bulunmuştur (Valenta ve ark., 2012). Çalışmalar sonucunda kadherin yapışma kompleksinde çok önemli olan ve Wnt-sinyal yolunda merkezi bir rol oynayan β -catenin'in çok önemli iki fonksiyonu olduğu gösterilmiştir.

Wnt, hücre kaderini etkileyen birçok sinyal yolağında aktif rol oynamaktadır. Ancak standart yolak veya Wnt / β -catenin sinyal yolu olarak adlandırılan sinyal yolağı en çok çalışılan yolaktır (Bonewald ve Johnson, 2008). Normal homeostaz koşullarında, deaktive form olan fosforile β -catenin, yıkım kompleksi adı verilen bir enzim kompleksinin bir parçasıdır. Bununla birlikte, reseptör aktivasyonunu takiben enzim kompleksinden ayrılan defosforile β -catenin'in bir kısmı hücre zarına gider ve hücre bağlantılarında görev alır (Kemler, 1993) diğer kısmı ise sitoplazmada birikir. Biriken β -catenin gen transkripsiyonunu başlatmak için çekirdeğe translokasyon gösterir (Wu ve ark., 2009). Böylelikle hücre zarında oluşan sinyali sitoplazmadan çekirdeğe kadar ulaştırmış olur (Brembeck ve ark. 2006).



Şekil 1.7. β -catenin'in hücre içi yerleşimi

Otokrin ve parakrin etki gösteren salgı proteini olan Wnt, transmembran reseptörü Frizzled ve LRP koreseptörlerine (Kemler, 1993; Wu ve ark., 2009 ve Xing ve ark., 2003) bağlanarak sinyalizasyonunu başlatır ve β -catenin'i enzim kompleksinden ayırır. Böylece, β -catenin sitoplazmada birikir ve transkripsiyon faktörleri ile çekirdeğe taşınarak hedef genlerin aktivasyonuna yol açar. Sclerostin (SOST) gibi Wnt reseptör antagonistleri; Wnt proteinlerine bağlanarak veya Wnt proteinleri ile bunların reseptörleri ve koreseptörleri arasındaki etkileşimlere müdahale ederek β -catenin'in translokasyonunu önler (Burgers ve Williams 2013; Canalis 2013; Chen ve ark. 2009 ve Dallas ve ark., 2013). Wnt proteinlerinin yokluğunda, β -catenin'in sitoplazmik seviyeleri düşük kalır (Aberle ve ark., 1997).

Bu yolağın yeni bileşenleri sürekli olarak keşfedilmektedir ve bu nedenle nasıl çalıştığı henüz tam olarak bilinmemektedir. Bu yolak üzerinden etki gösteren Wnt proteinleri, Wnt reseptörleri, koreseptörler, çözünür inhibitörler, modülatörler ve diğer moleküllerin sayısı her geçen gün artmakta ve böylelikle yolağın karmaşıklığı da artmaktadır.

Wnt reseptör aktivasyonu ile birden fazla yolun aktive edildiğine inanılmaktadır. β -catenin sinyal yolağının, kemikteki osteoblastik anabolik fonksiyonu düzenlemek için sinyal oluşturan kemik morfojenik protein 2 (BMP-2) ile etkileşimde olduğu ve BMP-2 ekspresyonunun aktivatörü olduğu bulunmuştur (Zhang ve ark., 2013). Wnt/ β -

catenin sinyal yolağının BMP-2 aracılığı ile kemik doku regülasyonunda oldukça önemli olduğu sonucuna varılmıştır.

Wnt iskelet oluşumu ve gelişimi için elzemdir ve uzuv modellemesi ve oluşumundan kondrogeneze, kemik matrisinin osteoblastlar tarafından sentezi, farklılaşması, proliferasyonuna ve ayrıca gelişim sırasında osteoklastların farklılaşması ve işlevine kadar çeşitli süreçlerde yer alır (Bonewald ve Johnson, 2008 ve Glass II ve Karsenty, 2006) . Genom çalışmaları (GWAS), bu sinyal yolağının birçok üyesinin kemik mineral yoğunluğu ve kırılmaya yatkınlık ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Hsu ve Kiel, 2012). Bu çalışmalar sonucunda, kemik oluşumunun ve Wnt/ β -catenin sinyal yolağının bir inhibitörü olan ve bu etkisini Wnt reseptörünün kompetitif antagonisti olarak sağlayan SOST ile; düşük kemik mineral yoğunluğu, osteoporoz ve kırılmaya yatkınlık arasında ilişkili bulunmuştur. Kırık onarımının ilk aşamalarında, pluripotent mezenşimal hücrelerin osteoblastlara veya kondrositlere ayrılması ve daha sonraki onarım aşamalarında preosteoblastların osteoblastlara farklılaşması için β -catenin gereklidir.

Spesifik olarak Wnt / β -catenin sinyali fibroblastlarda proliferasyonu ve motiliteyi yönlendirir ve transkripsiyon faktörlerini ve sinyal proteinlerini kodlayan genlerin ekspresyonunda geniş değişiklikleri indükler (Cheon ve ark., 2002; Cheon ve ark., 2004; Klapholz-Brown ve ark., 2007). Wnt / β -catenin sinyalizasyonu, sitoplazmik β -catenin'i stabilize eden bir hücre içi yanıtlar zincirini indükleyen hücre dışı Wnt ligandlarının varlığında aktiftir. Fibroblastlarda artmış stabilize β -catenin ekspresyonunun baskın etkisi, değiştirilmiş ekstraselüler maktriiks (ECM) morfolojisi ve gen ekspresyonudur. Çalışma modellerinde gösterilen β -catenin duyarlı matrisom genlerinin birçoğu proteoglikanları, glikoproteinleri ve matris metaloproteinazları kodlayan genlerdir.

1.4.1.β-catenin

β-catenin proteini ilk olarak 1989 yılında hücreler arası etkileşimde rol oynayan temel moleküllerden biri olarak tanımlanmıştır (Ozawa ve ark., 1989). β-catenin, hücre zarına yerleşmiş şekilde bulunan ve hücre adezyonunda görev yapan E-kaderin'in sitoplazma içindeki kısmı ile sitozolde bulunan hücre iskelet elemanlarından α-aktin arasında köprü görevi yapmaktadır. β-catenin proteininin *Drosophila*'da bulunan Armadillo (Arm) isimli protein ile homolojisinin belirlenmesi bu proteinin aynı zamanda bir transkripsiyon faktörü olarak da görev yaptığını ortaya çıkarmıştır (Mc Crea ve ark., 1991; Peifer ve ark., 1992).

β-catenin proteini 782 amino asitten oluşan 92 kDa ağırlığında bir proteindir. β-catenin proteininin 3 boyutlu konformasyonu artı yüklü oluklardan oluşan α-heliks şeklindedir ve birçok biyomolekül için de bağlanma bölgesi içerir. β-catenin proteininin yapısında bulunan bu artı yüklü oluklara APC, Axin ve TCF/LEF-1 gibi birçok molekül bağlanır (Xing ve ark., 2008 ve Xu ve ark.,2007). Etkileşim halinde bulunduğu bu biyomoleküllerin belirlenmesiyle β-catenin proteininin sadece hücre adezyonunda değil, Wnt/β-catenin sinyal yolağında da önemli görevler üstlendiği ortaya konulmuştur.

Wnt/β-catenin sinyal yolağının hedefi; hücre zarı, sitoplazma ve çekirdekteki β-catenin seviyesinin ayarlanmasıdır. Sinyal yolu inaktif olduğu durumda β-catenin fosforillenerak yıkılır. Sinyal yolu aktif olduğu durumda ise yıkıcı kompleks dağılır ve β-catenin'in sitoplazmadaki düzeyi artar. Yolağın hedef molekülü olması nedeniyle birçok hastalığın oluşum mekanizmasının belirlenmesi aşamasında β-catenin molekülünden yararlanılmaktadır. Sinyal yolunun kontrolsüz aktivasyonu ile sonuçlanan mutasyonlar bu mekanizmada görev alan hangi biyomolekülde meydana gelirse gelsin, çoğunlukla β-catenin molekülünün sitoplazmada birikimi ile sonuçlanmaktadır. Bu birikim çekirdekteki genlerin anormal transkripsiyonuna neden olur. Wnt / β-catenin sinyal yolunun hastalıklardaki rolünü belirlemeye yönelik çalışmalarda ilk olarak çoğunlukla sitoplazma ve çekirdekte β-catenin birikimi olup olmadığı immünohistokimya ve immünoflorasan gibi çeşitli yöntemler ile

değerlendirilmektedir. Sonuçlar sinyal yolunun aktif ya da inaktif olmasına göre aşağıdaki şekilde yorumlanmaktadır:

- Sinyal yolu inaktif durumdayken ve bu sinyal yolunda görev alan biyomoleküllerde herhangi bir mutasyon yokken β -catenin'in bir kısmı hücre-hücre bağlantılarında görev yapmak üzere hücre zarında bulunur. Geri kalan kısım ise sitozolde aktif halde bulunan yıkıcı kompleksin etkisi ile parçalanır. Yani sitoplazmada ve çekirdekte β -catenin birikimi gözlenmez (Brembeck ve ark., 2006).
- Sinyal yolu aktif durumda iken veya bu sinyal yolunda görev alan biyomoleküllerde meydana gelen bir mutasyonun etkisi ile oluşan kontrolsüz aktivasyon durumunda β -catenin parçalanamaz. Parçalanamayan β -catenin öncelikle sitoplazmada birikir, daha sonra da çekirdeğe girerek hedef genlerin transkripsiyonunu sağlar. Dolayısıyla bu durumda hücre zarının yanı sıra sitoplazma ve çekirdekte de β -catenin birikimi gözlenecektir (Willert ve Jones, 2006).

Periodontitis patogeneğinde önemli rolü olduğu bilinen NF- κ B sinyal yolağı ile ters etkileşimde bulunan ve birbirlerinin negatif regülatörü olduğu bilinen β -catenin'in periodontitis patogeneğinde etkili moleküllerden biri olabileceğı fikri gündeme gelmiştir (Deng ve ark., 2004). Periodontitis hastalarında β -catenin ekspresyonunu değerlendiren kısıtlı sayıda çalışma mevcut olmakla birlikte, yapılan çalışmalar sonucunda β -catenin ekspresyonunun periodontitis hastalarında sağlıklı kontrol gruplarına göre arttığı ve periodontal indeks değerleri ile pozitif korelasyon gösterdiği bulunmuştur (Chi ve ark., 2018; Liu ve ark., 2018).

1.4.2. Wnt proteinleri

Wnt geni, yaklaşık 25 yıl önce ilk olarak int-1 adı ile farenin tümörlü meme dokusundan klonlanmış olan bir gendir. Daha sonra, *Drosophila* 'da bulunan wingless geninin int-1 geni ile sekans ve fonksiyon benzerliğı gösterdiği saptanarak, 1991 yılında bu iki gen ismi birleştirilmiş ve bu gen literatüre Wnt geni olarak geçmiştir.

Günümüze kadar insanda tanımlanmış olan 19 adet Wnt geni bulunmaktadır (Nusse ve Varmus, 1992; Nusse, 2005).

Wnt proteinleri, birçok hücrenin normal fonksiyon görebilmesi için gerekli olan büyüme faktörlerini içeren büyük bir ailedir. Wnt 1a, 3a, 4, 5, 10b, 13 gibi Wnt proteinleri iki esas sinyal yolağını aktive ederek osteoblast formasyonunda önemli rol oynar (Liu ve ark., 2008 ve Westendorf ve ark., 2004). Nemoto ve ark., standart Wnt sinyal yolağının pluripotent mezenşimal hücrelerde Runx2 ve ALP kodlayan genlerin ekspresyonunu uyarak osteoblast diferansiasyonunu olumlu etkilediğini göstermişlerdir (Nemoto ve ark., 2009). Runx2 osteoblast diferansiasyonu ve kondrosit maturasyonu için esastır (Komori, 2005) ve Wnt sinyallerinin Runx2'yi uyarak osteoblast diferansiasyonunu indüklediği bilinmektedir (Cai ve ark., 2016). Wnt10b'nin aşırı üretimi; Runx2'nin upregulasyonuna bağlı olarak mezenşimal kök hücrelerin osteoblasta farklılaşmasına öncülük eder (Bennett ve ark., 2005).

P.gingivalis LPS'lerinin Wnt / β -catenin sinyal yolağını inhibe ederek osteojenik potansiyeli azalttığı bildirilmiştir (Bonsignore ve ark., 2013 ve Okahashi ve ark., 2004) Diğer taraftan in vitro çalışmalarda Wnt3a uygulamalarının Runx2/Osx ve osteokalsin ekspresyonu ile mineralizasyonu kısmen restore ettiği gösterilmiştir (Tang ve ark., 2014). Wnt3a'nın osteojenik diferansiasyonda potent regülatör olduğu (Baksh ve ark., 2007; Leclerc ve ark., 2008) ve bu etkinin tedavi sürecine bağlı olduğu rapor edilmiştir. Wnt 5a ekspresyonu ise bakteri duvarı komponentleri ve endotoksin ile uyarılmaktadır ve sepsis süresince makrofaj kaynaklı cevabın oluşturulmasında görevlidir ve TLR indüklü NF κ B sinyal yolağı aktivasyonu Wnt 5a ekspresyonunu uyarır (Pereira ve ark., 2008).

1.4.3.Runx2:

Klasik Wnt / β -catenin sinyal yolu osteoblast farklılaşması (Day ve ark., 2005; Hill ve ark., 2005) kemik oluşumu ve kemik kütlesi için önemlidir (Bennett ve ark., 2005). LRP5 genindeki fonksiyon kaybı mutasyonlarından kaynaklanan osteoporoz-psödoglioma sendromu, kemik homeostazı için normal Wnt / β -catenin sinyalizasyonunun önemi konusunda en çarpıcı kanıtlardan biridir (Boyden ve ark., 2002 ve Gong ve ark., 2001). Osteoblastlarda, Wnt / β -catenin yolu ayrıca, NF- κ B ligandının (RANKL) neden olduğu osteoklastogenezin reseptör aktivatörünün güçlü ve spesifik inhibitörü olan osteoprotegerin (Opg) ekspresyonunu ve bu mekanizma aracılığıyla ayrıca osteoklast farklılaşmasını ve rezorpsiyonunu kontrol eder (Glass ve ark., 2005). Ayrıca, Wnt / β -catenin, mezenşimal hücrelerde Runx2 ekspresyonunu düzenler, böylece osteoblast farklılaşmasını ve iskelet gelişimini kontrol eder (Gaur ve ark., 2005).

Runx2, osteoblast gelişimi ve kemik oluşumu için gerekli olup; pluripotent mezenşimal hücrelerin osteoblastlara farklılaşmasını uyarır ve osteoblastlarda osteokalsin dahil olmak üzere birçok osteoblastla ilişkili hücre dışı matris proteinlerinin ekspresyonunu düzenleyerek olgunlaşmalarını ve işlevlerini artırır (Komori ve ark., 1997). Runx2'nin kemik metabolizmasıyla ilişkisine ilişkin çeşitli çalışmalar yapılmış ve Runx2 mutasyonunun kleidokraniyal dizostoz ile ilişkili olduğu, Runx2 eksikliğinde farelerde osteoblast yokluğuna bağlı kartilaj iskelete sahip farelerin geliştiği gibi sonuçlara ulaşılmıştır (Otto ve ark., 1997). Bununla birlikte, Runx2'nin osteoblast farklılaşmasını, kemik oluşumunu ve kemiğin yeniden şekillenmesini nasıl kontrol ettiği açıklığa kavuşturulamamıştır. Liu ve ark. yaptıkları çalışmada osteoklastogenezde artış olmamasına rağmen, artan Runx2 ekspresyonuyla birlikte osteoklast aktivitesinin de arttığını ve osteoblast sayısı artmış olmasına rağmen matriks üretimi ve mineralizasyonun bozulduğunu göstermişlerdir (Liu ve ark., 2001). Çalışma sonucunda Runx2'nin aşırı ekspresyonunun, kemik kütlesi ve kemik hacminde kayda değer bir azalmaya yol açarak spontan kırıkların gelişmesine yol açtığını bulunmuşlar. Runx2'nin aşırı ekspresyonuna osteoklast farklılaşması ve daha yüksek Rankl / Opg oranı eşlik ettiği gösterilmiştir (Geoffroy ve ark., 2002). Bu

bulgular, Runx2'nin in vitro Rankl ve Opg ekspresyonunun doğrudan bir düzenleyicisi olarak rol oynadığını desteklemektedir (Gao ve ark., 1998).

Literatürde Wnt/ β -catenin sinyal yoluyla ilişkili olarak periodontitis patogeneğinde Runx2 aktivitesini değerlendiren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak periodontitise bağlı hipoksi koşullarında Runx2 ekspresyonunun düştüğü gösterilmiştir (Li ve ark., 2016). Runx2'nin uzun zincirli ve kısa zincirli izoformları bulunup (Lee ve ark., 2005) periodontitisli hastalardan elde edilen gingival fibroblastlarla yapılan hücre kültürü çalışmasında sadece gingival fibroblastlar tarafından eksprese edilen uzun zincirli Runx2'nin ekspresyonunun düştüğü gösterilmiş ve bu durum Runx2'nin ekstrasellüler matriksi kontrol etme özelliğine atfedilerek, kollajen degradasyonu sonucunda periodontitis patogeneziyle ilişkilendirilmiştir (Horie ve ark., 2016).

Periodontitis patogeneğinde birçok mekanizma rol almakla birlikte, hastalığın patofizyolojisi henüz netlik kazanmamıştır ve incelenmesi gereken birçok sinyal yolağı mevcuttur. Tüm bu literatür bulgularının ışığında, Wnt / β -catenin sinyal yolağının periodontitiste doku yanıtının düzenleyicisi olabileceği ve farklı periodontal hastalık formlarında farklı şekilde eksprese edilebileceği hipotezinden hareketle tez çalışmamızın esas amacı, kronik ve agresif periodontitisli hastalardan elde edilen dişeti örneklerinde Wnt / β -catenin sinyal moleküllerinin salınımını (Wnt 3a, 5a, 10b, Runx2) ve doku yoğunluklarını değerlendirmektir. İlgili moleküllerin ekspresyon miktarlarını değerlendirmek amacıyla RT PCR, doku yoğunluklarını değerlendirmek amacıyla immunohistokimyasal yöntem kullanılmıştır.

2.GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Çalışma Dizaynı ve Örneklem Seçimi

Kesitsel, randomize olmayan paralel kontrollü, açık etiketli klinik çalışma dizaynında planlanan bu çalışma, Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan onay alındıktan sonra Eylül 2017 - Haziran 2019 tarihleri arasında Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı Kliniğinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmamıza kliniğimize başvuran, 1999 AAP sınıflamasında (Armitage, 1999) belirlenen kriterlere uygun olarak generalize kronik periodontitis tanısı konmuş sistemik olarak sağlıklı 15, generalize agresif periodontitis tanısı konmuş sistemik olarak sağlıklı 11 ve hem sistemik hem de periodontal açıdan sağlıklı 15 gönüllü birey dahil edilmiştir. Çalışmada aşağıda belirtilen kriterlere sahip, gönüllü onam formunu imzalayan toplam 41 birey dahil edilmiştir:

- 18 yaşından büyük,
- 3. molar dişler haricinde en az 15 daimi doğal dişi mevcut olan,
- Herhangi bir ortodontik aparey kullanmayan,
- Hamile/laktasyon döneminde olmayan,
- Periodontal sağlığı etkilemesi muhtemel herhangi bir sistemik hastalığı olmayan,
- Sistemik olarak sağlıklı,
- Son 6 ay içinde anti-mikrobiyal ve/veya anti-inflamatuar ilaç kullanmamış,
- Son 1 yıl içinde periodontal tedavi görmemiş
- Sigara kullanmayan

1999 sınıflamasına göre generalize agresif periodontitis ve generalize kronik periodontitis tanısı konularak tez çalışmamıza dahil edilen hastalar; 2017 yılında sınıflamasında 5 mm ve üzerinde cep derinliği varlığı ve horizontal kemik kaybı ile beraber vertikal kemik kaybının gözlenmesi nedeniyle Evre III ve %kemik kaybı/yaş değerinin 1'den büyük olması nedeniyle Derece C olarak sınıflandırılmıştır.

Tüm bireylere çalışma öncesinde hastalıklarının durumu, çalışmanın önemi ve tedavi yöntemi ile yapılacak uygulama hakkında bilgi verilerek hastaların onayı alınmıştır. Bu çalışmada yürütülen her türlü işlem 26.05.2017 tarihli, 36290600/52 nolu Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı dahilinde gerçekleştirilmiştir.

2.2. Çalışma Gruplarının Belirlenmesi

Çalışma gruplarının sınıflandırılması ve periodontal hastalıkların teşhisi Amerikan Periodontoloji Akademisi tarafından 1999'da düzenlenen, Periodontal hastalıkların sınıflandırılması için yapılan uluslararası çalıştayında belirlenen kriterlere göre yapılmıştır. Kriterlere uyan ve çalışmaya katılmayı kabul eden toplam 41 birey şu şekilde gruplandırılmıştır:

- 1- Generalize kronik periodontitis (GKP) grubu:** Her bir çenede en az 4 dişte sondalama derinliği (SD) ≥ 5 mm ve klinik ataşman kaybı (KAK) ≥ 4 mm olması ve tüm ağız kanama skorunun $>80\%$ olması durumudur. Klinik ve radyografik muayene sonucu GKP tanısı koyulan 9 kadın, 6 erkek toplam 15 hasta bu gruba dahil edilmiştir.
- 2- Generalize agresif periodontitis (GAP) grubu:** Kesici dişler ve /veya birinci büyük azı dişini içeren en az 6 daimi dişte ve bu dişlere ilave olarak en az 6 daimi dişin en az bir bölgesinde sondalama derinliğinin ve klinik ataşman kaybının ≥ 5 mm olması ve ailesel geçiş (her gönüllüye aile üyelerinde geçerli olan ya da geçmişte gözlenmiş olan şiddetli periodontal

hastalık olup olmadığı sorulmuştur) ve hızlı periodontal yıkım hikayesinin bulunması durumudur. Klinik ve radyografik muayene sonucu GAP tanısı koyulmuş 7 kadın, 4 erkek toplam 11 hasta bu gruba dahil edilmiştir.

3- Sağlıklı kontrol grubu (K): Alveolar kemik kaybı belirtisi olmaması ve tüm ağız kanama skorunun <20 olması durumudur. Klinik ve radyografik muayene sonucu herhangi bir periodontal hastalığı tespit edilmemiş, 7 kadın, 8 erkek toplam 15 birey bu gruba dahil edilmiştir.

2.2.1. Bireylerin Periodontal Durumlarının Belirlenmesi

Çalışmaya dahil edilen bireylerin periodontal durumlarının belirlenmesi amacıyla ağızdaki tüm dişlerden sondalama derinliği miktarı (SD), klinik ataçman kaybı (KAK), plak indeksi (PI) ve gingival indeks (GI) değerleri, sondalamada kanama (SK), dişeti çekilmesi (DÇ) varlığı değerlendirilerek kaydedilmiştir. Yapılan tüm klinik ölçümler, elde edilecek biyopsi materyalini etkilememesi için ilk seansta yapılarak örnek alınacak bölgeler tespit edilmiştir.

2.2.1.1.Sondalama Derinliğinin Belirlenmesi

Çalışmaya katılan tüm bireylerden SD ölçümleri, Williams periodontal sondası (LM Dental AB, Nynäshamn, İsveç) kullanılarak her dişin meziobukkal, bukkal, distobukkal, meziolingual, lingual, distolingual olmak üzere toplam 6 ayrı noktasından ölçülerek milimetre (mm) cinsinde kaydedilmiştir. Ölçümler sırasında sondun kendi ağırlığı ile dişin uzun aksına paralel olarak kullanılmasına özen gösterilmiştir. Her hasta için ağız ortalaması hesaplanmıştır.

2.2.1.2.Dişeti Çekilmesinin Belirlenmesi

Mine sement birleşimi ve dişeti kenarı arası mesafe olarak tanımlanan dişeti çekilmesi (DÇ) ölçümleri, çalışmaya katılan tüm bireylerden Williams periodontal sondası kullanılarak araştırmaya dâhil edilen dişlerin meziobukkal, bukkal, distobukkal, meziolingual, lingual, distolingual olmak üzere toplam 6 ayrı noktasından milimetrik olarak yapılmıştır. Her hasta için ağız ortalaması hesaplanmıştır.

2.2.1.3.Klinik Ataçman Kaybının Belirlenmesi

KAK'ın belirlenmesi amacıyla referans noktası olarak mine sement sınırı belirlenmiş ve referans noktası ile cep tabanı arasındaki mesafe periodontal sond ile ölçülerek mm cinsinden kaydedilmiştir. KAK her diş için 6 bölgeden (meziobukkal, bukkal, distobukkal, meziolingual, lingual, distolingual) kaydedilmiştir.

2.2.1.4.Dental Plak Varlığı ve Birikim Düzeyinin Belirlenmesi

Dişlerin etrafındaki plak birikimi Silness ve Loe tarafından geliştirilen Pİ kullanılarak kaydedilmiştir. (Silness ve Loe, 1964). Buna göre;

0. Plak bulunmadığını,
1. Serbest dişeti kenarına ve komşu diş yüzeyine tutunmuş film şeklinde ve periodontal sond yardımı ile fark edilebilen plak varlığını,
2. Çıplak gözle dişeti kenarında ve diş yüzeyinde gözle görülebilen yumuşak eklenti varlığını,
3. Dişeti kenarında ve diş yüzeyinde aşırı derecede yumuşak eklenti varlığını göstermektedir.

Pİ her diş için 6 bölgeden (meziobukkal, bukkal, distobukkal, meziolingual, lingual, distolingual) kaydedilmiştir. Her hasta için Pİ değeri şu şekilde hesaplanmıştır:

$$P\bar{I} = \text{Tüm dişlerdeki Pİ toplamı} / \text{Toplam diş yüzey sayısı}$$

2.2.1.5. Dişetinde Klinik İltihap Varlığı ve Şiddetinin Belirlenmesi

Dişetindeki klinik iltihap varlığı/şiddeti Löe ve Silness tarafından geliştirilen Gingival İndeks (Gİ) kullanılarak kaydedilmiştir (Löe ve Silness, 1963). Buna göre;

0. Normal dişetini,

1. Hafif iltihap, hafif renk değişikliği, hafif ödem varlığı ile birlikte sondalamada kanama olmadığını,

2. Orta derecede iltihap, hiperemi, ödem ve parlaklıkla beraber sondalamada kanama varlığını,

3. Şiddetli iltihap, bariz hiperemi ve ödem, ülserasyon ve spontan kanamaya eğilim varlığını belirtmektedir.

Gİ her diş için 6 bölgeden (meziobukkal, bukkal, distobukkal, meziolingual, lingual, distolingual) kaydedilmiştir. Her hasta için Gİ değeri şu şekilde hesaplanmıştır:

$$G\bar{I} = \text{Tüm dişlerdeki Gİ toplamı} / \text{Toplam diş yüzey sayısı}$$

2.2.1.6.Sondalamada Dişeti Kanamasının Belirlenmesi

Sondalama ile meydana gelen dişeti kanamasının değerlendirilmesinde Ainamo ve Bay tarafından geliştirilen Sondalamada Kanama İndeksi (BOP) kullanılmıştır (Ainamo ve Bay, 1975). Bu indekse göre;

Pozitif (+), Sondalamada kanama varlığını,

Negatif (-), Sondalamada kanama olmadığını göstermektedir.

BOP periodontal sond kullanılarak cep içerisinde sondun kendi ağırlığınca basınç uygulanmasını takiben her dişin 6 bölgesi için (meziobukkal, bukkal, distobukkal, meziolingual, lingual, distolingual) değerlendirilerek pozitif (+) veya negatif (-) olarak belirlendi ve yüzde olarak kaydedilmiştir. Her hasta için sondalamada kanama değeri yüzdesi şu şekilde hesaplanmıştır;

SK yüzdesi= sondalamada kanaması olan diş yüzey sayısı x100 / toplam diş yüzey sayısı

2.3.Doku Örneklerinin Toplanması

Kron boyu yükseltme ve estetik nedenli gingivektomi endikasyonu konulan periodontal olarak sağlıklı bireylerin cerrahi sırasında uzaklaştırılan dokuları ve periodontitis nedeniyle çekim endikasyonu konulan dişlerin çekimi sırasında bu dişlerin etrafından dişeti epiteli ve bağ dokusunu içerecek şekilde alınacak doku örnekleri biyopsi materyali olarak kullanılmıştır. Bu amaçla eksize edilen dokuların yarısı yapılacak PCR analizinde kullanılmak üzere RNALater (Roche) solüsyonu içerisinde -80°C’de, diğer yarısı ise immunohistokimyasal analizde kullanılmak üzere %10’luk formalin solüsyonu içerisinde saklanmıştır.

2.4.Deneylerin Uygulanması

Elde edilen doku örneklerinde tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α), Wnt 3a, Wnt 5a, Wnt 10b, β -catenin ve Runx2 ekspresyonlarının değerlendirilmesi amacıyla RT PCR yöntemi ve Wnt 5a, Wnt 10b ve β -catenin yoğunluklarının değerlendirilmesi için immunohistokimyasal analiz yöntemleri uygulanmıştır.

2.4.1.Dişeti Dokusunda Wnt 5a, Wnt 10b ve β -Catenin Yoğunluklarının İmmunohistokimyasal Analiz Yöntemi ile Değerlendirilmesi

Elde edilen biyopsi örnekleri eşit olarak ikiye bölünmüş ve immünohistokimyasal analiz için kullanılacak parça 10%'luk formalin solüsyonu ile fikse edilmiştir.

- Derecelendirilmiş etanol serilerinde dehidratasyon
- Parafine gömme
- 6 μ m kalınlığında kesit
- Hematoksilen ve eosin ile boyama
- Ardından Wnt 5a, 10b ve β -catenin için üretici firmanın önerileri doğrultusunda immunohistokimyasal boyama yapılmıştır.

Tüm değerlendirmeler randomize olarak seçilen 20 high power ($\times 40$) sahadan uzman bir patolog tarafından yapılmıştır. Sonuçlar aşağıdaki şekilde değerlendirilmiştir.

2.4.1.1.Epitelyal Özellikler

Hematoksilen ve eosin boyama ile epitelyal değişiklik değerlendirilmiş ve skarlama aşığıdaki gibi yapılmıştır:

Skor 0: Anlamli epitelyal değişiklik yok

Skor 1: Hafif derecede akantoz, parakeratoz ve dejeneratif değişiklik

Skor 2: Şiddetli epitelyal hiperplazi, pseudoepitelyamatöz değişiklikler, intraepitelyal ödem, subepitelyal invajinasyon

2.4.1.2.Sub-epitelyal İnflamasyon Yoğunluğu

Hematoksilen ve eosin boyama ile inflamasyon yoğunluğu değerlendirilmiş ve skarlama aşığıdaki gibi yapılmıştır:

Skor 0: Normal mukoza

Skor 1: Hafif derece yoğunlukta lenfosit ve plazma hücre infiltrasyonu (400 büyük büyütme alanında <50 lenfosit ve plazma hücreleri içeren kronik inflamatuvar hücre infiltrasyonu)

Skor 2: Orta derece yoğunlukta lenfosit ve plazma hücre infiltrasyonu (400 büyük büyütme alanında <100 lenfosit ve plazma hücreleri içeren kronik inflamatuvar hücre infiltrasyonu)

Skor 3: Lenfosit, plazma hücresi, makrofaj ve PMNL'leri içeren yoğun inflamatuvar hücre infiltrasyonu (400 büyük büyütme alanında >100 inflamatuvar hücre infiltrasyonu)

2.4.1.3.Wnt 5a, Wnt 10b ve β -Catenin için İmmunohistokimyasal Değerlendirme

Üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapılan immunohistokimyasal boyama sonuçları epitel ve subepitelyal bağ dokusu için ayrı ayrı yapılmış olup nükleer ve sitoplazmik boyanma yoğunlukları ayrıca değerlendirilmiştir. Epitelyal boyamada basal tabaka içerisinde devamlılık göstermeyen (ardışık olmayan) basal melanositik melanin pigmenti olabilecek kahverengi boyanmalar değerlendirme dışı bırakılmıştır. Bu amaçla aşağıdaki skarlama sistemi kullanılmıştır:

Skor 0: Boyanma yok

Skor 1: Hafif boyanma (zayıf kahverengi boyanma)

Skor 2: Şiddetli boyanma (yoğun kahverengi boyanma)

2.4.2.Dişeti Dokusunda TNF- α , Wnt 3a, Wnt 5a, Wnt 10b, β -Catenin ve Runx2 Gen Ekspresyonlarının Realtime PCR ile Değerlendirilmesi

Elde edilen biyopsi örnekleri eşit olarak ikiye bölünmüş ve Realtime PCR analizi için kullanılacak parça RNALater (Roche) solüsyonunda -80°C’de saklanmıştır.

2.4.2.1.Doku Parçalama ve RNA İzolasyonu

Taze dokular RNALater (Roche) solüsyonunda -80°C’de saklandıktan sonra MagnaLyser (Roche) cihazı ile Tripure (Roche) kullanılarak parçalanmıştır ve aşağıdaki basamaklar uygulanarak RNA izolasyonu yapılmıştır.

İzolasyon basamakları;

1. Homojenize edilen dokular 5 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir.

2. 200 µl kloroform eklendikten sonra karıştırılarak ve 2-3 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir.
3. 12000 rpm de 15dk 4°C' de santrifüj edilmiştir.
4. Santrifüj sonrası oluşan en üst fazda bulunan RNA toplanacak ve 500 µl izopropanol içeren yeni tüpe alınmıştır.
5. RNA ve izopropanol içeren tüp alt üst edilerek karıştırılacak ve 10 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir.
6. 12000 rpm de 10 dk 4°C' de santrifüj edilmiştir.
7. Santrifüj sonrası süpernatant dikkatli bir şekilde dökülecek. Pelet üzerine 1 ml DEPC içeren %70 etanol eklenmiş ve vorteks yapılmıştır.
8. RNA'nın degrade olmasını ve kırılmasını önlemek için düşük hızda (7500 rpm) 10 dk 4°C' de santrifüj edilmiştir.
9. Santrifüj sonrası %70 etanol dökülmüş ve tüplerin kapakları açık bırakılarak RNA peleti kurutulmuştur.
10. Pelet miktarına bağlı olarak 20-25 µl RNaz içermeyen su (% 0,1 DEPC'li su) eklenmiştir.
11. 60°C' de 10 dk bekletilmiş ve analize kadar -20°C' de, analiz sonrası -80°C' de saklanmıştır.

2.4.2.2.cDNA Sentezi

Dokulardan izole edilen RNA'ların miktar ve kalitesi NanoDrop (Termo) ile ölçülmüştür. Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche) ile cDNA sentezi yapılmıştır.

2.4.2.3.Realtime PCR ile Ekspresyon Çalışması

41 diş eti dokusu örneklerinden sentezlenen cDNA örnekleri kullanılarak belirlenen 6 adet genin ekspresyonuna bakılmıştır ve primer-probe dizaynları yapılarak RealTime Ready Single Assay kitleri (Roche) kullanılmıştır. LightCycler 480'de (Roche) Real Time PCR yapılmış ve gen ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir.

2.5.İstatistiksel Analiz

Agresif periodontitis, kronik periodontitis ve sağlıklı gruba ait olmak üzere üç grubun Wnt 3a, 5a, 10b, Runx2, TNF- α değişkenleri karşılaştırılmıştır. Birincil karşılaştırma değişkeni olan Wnt 5a için örneklem büyüklüğü hesaplanmıştır. Agresif, kronik ve sağlıklı için sırasıyla öngörülen ortalama ve standart sapma değerleri 1.30 ± 0.26 , 1.44 ± 0.26 , 1 ± 0.26 dır. Buradan Tek yönlü Varyans Analizi için etki genişliği 0.71, %80 güç ve %5 alfa alındığında örneklem büyüklüğü en az her bir grupta 8'er olmak üzere toplam 24 kişi hesaplanmıştır. Hesaplamalar G*Power 3.0.10 programında yapılmıştır.

İstatistik analizleri için SPSS for Windows programı kullanılmıştır. Normal dağılımı değerlendirmek için Shapiro Wilk testi yapılmıştır. Normal dağılım göstermeyen gruplarda karşılaştırmak için Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Verilerde Benforrini düzeltmesi yapılmıştır. Normal dağılım gösteren veriler ANOVA testi uygulanmıştır. Verilerin gruplar arası korelasyonunu değerlendirmek amacıyla Pearson's ve Spearman korelasyon testi kullanılmıştır. İmmunohistokimyasal analiz verilerinin gruplar arası karşılaştırılması amacıyla Chi-square testi kullanılmıştır. Anlamlılık P değeri <0.05 seçilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Periodontal Hastalık ve Kontrol Gruplarındaki Tanımlayıcı Bulgular

Çalışmamızda GAP grubunda 7'si kadın ve 4'ü erkek toplam 11 kişi, GKP grubunda 9'u kadın 6'sı erkek toplam 15 hasta ve K grubunda 7'si kadın 8'i erkek toplam 15 sağlıklı birey değerlendirmeye alınmıştır.

Araştırmaya katılan bireylerde yaş dağılımı GAP grubunda 25-42 arasında, yaş ortalaması ise 33 ± 5.52 'dir. GKP grubunda yaş dağılımı 34-65 arasında, yaş ortalaması ise 44.40 ± 9.37 'dir. K grubunda yaş dağılımı 23-47 arasında, yaş ortalaması ise 32.73 ± 7.79 'dur (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 Araştırmaya katılan bireylerin cinsiyet dağılımı ve yaş ortalamaları

	Kontrol (n=15)	Generalize Agresif Periodontitis (n=11)	Generalize Kronik Periodontitis (n=15)
Kadın/Erkek (n)	7 / 8	7 / 4	9 / 6
Yaş (yıl; ortalama $\pm$ SS)	32.73 ± 7.79	33 ± 5.52	44.40 ± 9.37

3.2. Klinik Bulgular

Periodontal parametreler hem hasta grupları hem de kontrol grubu için tüm ağızdan ve dişeti biyopsilerinin alındığı dişlerden elde edilmiştir (Çizelge 3.2).

Tüm ağızdan elde edilen klinik periodontal parametreler, hem GKP hem de GAP gruplarında K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ($p<0.001$). BOP ve KAK haricinde diğer klinik periodontal parametreler açısından hastalık grupları arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmayıp, bu iki parametre GKP grubunda GAP grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur ($p<0.001$).

Çizelge 3.2. Klinik Periodontal Parametrelerin Gruplar Arası Karşılaştırması

Klinik Parametreler	Kontrol (n=15)	Generalize Agresif Periodontitis (n=11)	Generalize Kronik Periodontitis (n=15)
Pİ (Tüm ağız)	0.51 ± 0.32 0.51 (0.20-0.70)	1.36 ± 0.55 1.20 (0.07-1.5)*	1.74 ± 0.56 1.82 (1.17-2.13)*
Gİ (Tüm ağız)	1.13 ± 0.23 0.04 (0.03-0.09)	1.05 ± 0.47* 1.03 (0.8-1.34)	0.94 ± 0.39* 0.94 (0.68-1.06)
SD (mm) (Tüm ağız)	1.55 ± 0.31 1.50 (1.36-1.72)	3.73 ± 0.84* 3.32 (4.42-3.08)	4.09 ± 0.57* 4.06 (3.62-4.68)
BOP (%) (Tüm ağız)	9.46 ± 4.03 9.5 (6.13-12.73)	68.75 ± 11.40*¥ 66.33 (60.35-79.40)	81.34 ± 10.70* 84.0 (72.0-90.0)
KAK (mm) (Tüm ağız)	1.58 ± 0.30 1.57 (1.39-1.72)	4.08 ± 0.99*¥ 3.78 (3.50-4.55)	5.31 ± 0.89* 5.21 (4.72-6.16)
Pİ (Bölgeye özgü)	0 -	1.43 ± 0.67*¥ 1.11 (1.0-1.44)	2.67 ± 0.47* 3.0 (2.0-3.0)
Gİ (Bölgeye özgü)	0 -	1.51 ± 0.46*¥ 1.54 (1.0-2.0)	2.33 ± 5.57* 2.0 (2.0-3.0)
SD (mm) (Bölgeye özgü)	2.82 ± 0.19 2.83 (2.73-3.0)	9.63 ± 0.97* 10 (10-10)*	8.60 ± 1.52* 9.61 (7.01-10)*
BOP (%) (Bölgeye özgü)	0 -	89.78 ± 14.23*¥ 100 (80.4-100)	96.3 ± 10.1* 100 (82.9-100)

Pİ: plak indeksi; Gİ: gingival indeks; SD: sondalama derinliği; BOP: sondalamada kanama;

KAK: klinik ataçman kaybı.

Veriler ortalama ± standart sapma ve ortanca-çeyrekler arası genişlik olarak verilmiştir.

Verilerde Benforrini düzeltmesi yapılmıştır. Normal dağılım gösteren veriler Anova testi ile, normal dağılım göstermeyen veriler Kruskal-Wallis testi ile değerlendirilmiştir.

* Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılık (p<0.001)

¥ İki hastalık grubu arasında istatistiksel anlamlı farklılık (p<0.001).

Bölgeye özgü değerlendirmede bütün periodontal parametreler hastalık gruplarında kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermiştir (p<0.001). Bölgeye özgü Pİ, Gİ ve BOP değerleri GKP grubunda GAP grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur (p<0.001).

3.3. RT PCR Analizi Bulguları

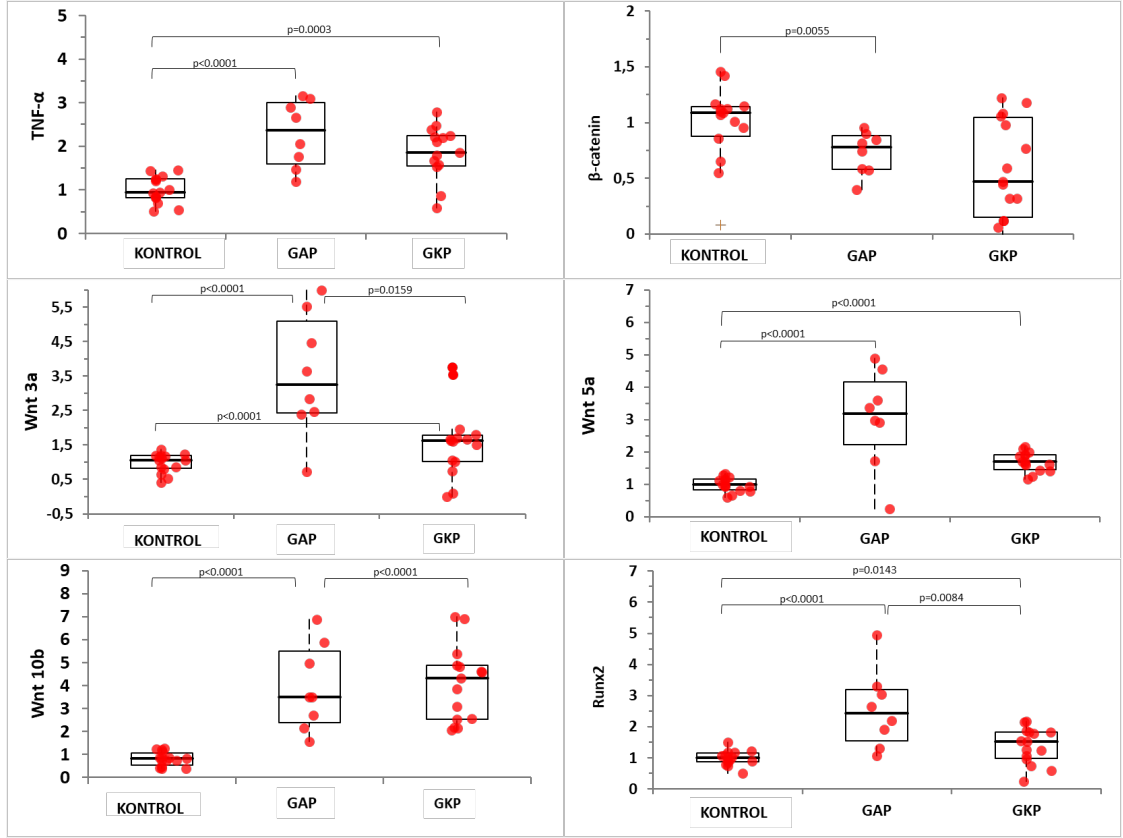
RT PCR analizi Wnt 3a, Wnt 5a, Wnt 10b, Runx2, β -catenin ve TNF- α 'ya ait mRNA seviyelerini değerlendirmek amacıyla yapılmıştır (Çizelge 3.3a, 3.3b). Wnt 3a, Wnt 5a, Wnt 10b, Runx2 ve TNF- α 'nın PCR yöntemi ile değerlendirilen mRNA seviyeleri, her iki hastalık grubunda, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur ($p<0.0001$). Wnt 3a ve Runx2 ekspresyon seviyeleri GAP grubunda GKP grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur (sırasıyla $p=0.0159$, $p=0.0084$). GAP grubunda β -catenin ekspresyonu sağlıklı kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşüktür ($p<0.05$). Wnt 10b ekspresyonu GKP grubunda GAP grubuna göre daha yüksek olmakla birlikte fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0.83$).

Çizelge 3.3a. RT PCR Bulgularının Gruplar Arası Karşılaştırması

Klinik Parametreler	Kontrol (n=15)	Generalize Agresif Periodontitis (n=11)	Generalize Kronik Periodontitis (n=15)
TNF- α	1 $\pm$ 0.3	2.29 $\pm$ 0.77*	1.73 $\pm$ 0.82*
β -catenin	0.99 $\pm$ 0.35	0.57 $\pm$ 0.45*	0.73 $\pm$ 0.2
Wnt 3a	0.98 $\pm$ 0.28	3.51 $\pm$ 1.76*¥	1.59 $\pm$ 1.03*
Wnt 5a	1 $\pm$ 0.22	3.04 $\pm$ 1.5*	1.7 $\pm$ 0.3*
Wnt 10b	0.8 $\pm$ 0.3	3.9 $\pm$ 1.86*	4.06 $\pm$ 1.63*
Runx2	1 $\pm$ 0.23	2.55 $\pm$ 1.24*¥	1.39 $\pm$ 0.58*

Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. Verilerde Benforrini düzeltmesi yapılmış ve veriler Kruskal-Wallis testi ile değerlendirilmiştir.
* Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılık ($p<0.001$)
¥ İki hastalık grubu arasında istatistiksel anlamlı farklılık ($p<0.05$).

Çizelge 3.3b. RT PCR Bulgularının Gruplar Arası Karşılaştırması



3.4. İmmunohistokimyasal Analiz Bulguları

H&E ile boyama yöntemi ve immunohistokimyasal analizde, biyopsi materyalinde cep epiteli/sulkuler epitel ve subepitelyal bağ dokusu değerlendirilmiştir.

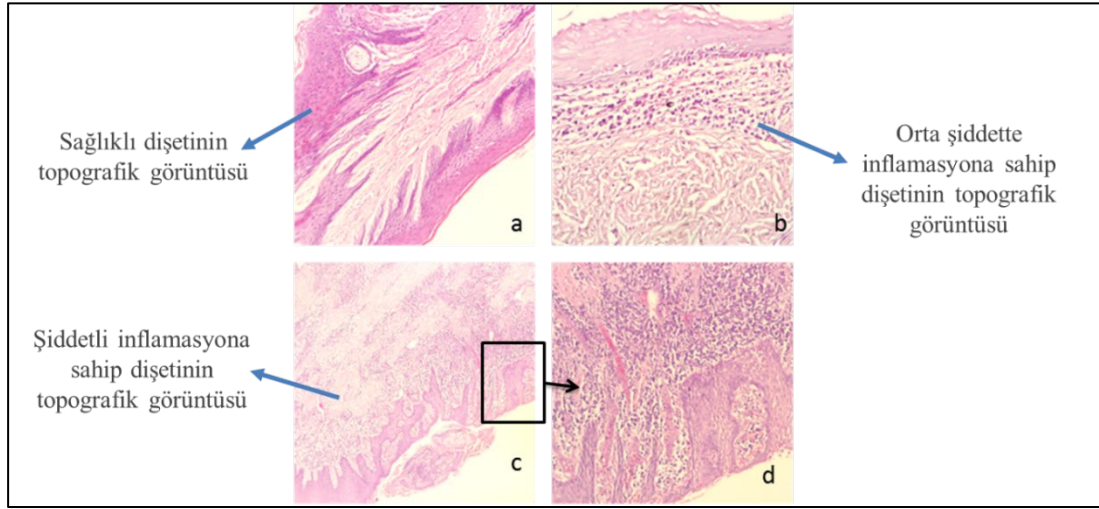
H&E boyama yöntemi ile dokularda gözlenen epitelyal değişiklik ve inflamasyon yoğunluğu değerlendirilmiştir (Çizelge 3.4.). Epitel dokuda gözlenen değişiklik açısından K grubunda sıklıkla 0 ve 1 skorları elde edilirken şiddetli epitelyal hiperplazi ve inflamatuvar değişiklikleri işaret eden 2 skoru alınmamıştır. Hastalık gruplarında ise sıklıkla 2 skoru elde edilmiştir.

Subepitelyal alanda inflamasyon incelendiğinde her iki hastalık grubunda da Lenfosit, plasma hücresi, makrofaj ve PMNL'leri içeren yoğun inflamatuvar hücre infiltrasyonu ile beraber yoğun inflamatuvar yanıtı işaret eden 2 skorunun yoğunlukta

olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.1.c/d). Kontrol grubunda ise düşük oranda hafif inflamataur hücre infiltrasyonu izlenirken sıklıkla normal mukozal görünüm ile karşılaşılmıştır.

Çizelge 3.4. H&E ile Boyamada İnflamasyon Yoğunluğu ve Epitelyal Değişikliğin Gruplar Arası Karşılaştırması

		Kontrol (n=15)	Generalize Agresif Periodontitis (n=11)	Generalize Kronik Periodontitis (n=15)	p
Epitelyal Değişiklik (H&E)	Skor 0 (Anlamlı epitelyal değişiklik yok)	8 (%19.51)	0 (%0)	0 (%0)	0.0003*
	Skor 1 (Hafif derecede dejeneratif değişiklik)	7 (%17.07)	3 (%7.31)	6 (%14.63)	
	Skor 2 (Şiddetli dejeneratif değişiklik)	0 (%0)	8 (%19.51)	9 (%21.95)	
Sub-epitelyal İnflamasyon Yoğunluğu (H&E)	Skor 0 (Normal mukoza)	11 (%26.82)	0 (%0)	0 (%0)	0.0002*
	Skor 1 (Hafif yoğunlukta inflamatuvar hücre infiltrasyonu)	4 (%9.75)	1 (%2.43)	3 (%7.31)	
	Skor 2 (Orta yoğunlukta inflamatuvar hücre infiltrasyonu)	0 (%0)	3 (%7.31)	4 (%9.75)	
	Skor 3 (Şiddetli inflamatuvar hücre infiltrasyonu)	0 (%0)	7 (%17.07)	8 (%19.51)	
Chi-square testi kullanılmıştır.					
* Gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı farklılık (p<0.001)					



Şekil 3.1. H&E boyamada inflamasyon şiddetine ait her bir grade için topografik görüntüler

Epitel dokuda intrastoplazmik boyanma yoğunlukları değerlendirildiğinde β -catenin için K ve GAP gruplarında sıklıkla 2 skoru elde edilirken, GKP grubunda sıklıkla 1 skoru elde edilmiştir (Çizelge 3.5). Wnt 10b, K ve GKP gruplarında boyanmazken GAP grubunda hafif yoğunlukta boyanma göstermiştir. Wnt 5a ise periodontitis gruplarında sıklıkla hafif yoğunlukta boyanmıştır.

Çizelge 3.5. İmmünohistokimyasal Boyama Sonucunda Antijenlerin Epitelyal Dokuda İntrastoplazmik Boyanma Yüzdelelerinin Gruplar Arası Karşılaştırması

		Kontrol (n=15)	Generalize Agresif Periodontitis (n=11)	Generalize Kronik Periodontitis (n=15)	p
β -catenin	Skor 0	2 (%4.87)	0 (%0)	2 (%4.87)	0.8294
	Skor 1	4 (%9.75)	3 (%7.31)	9 (%21.95)	
	Skor 2	9 (%21.95)	8 (%19.51)	4 (%9.75)	
Wnt 10b	Skor 0	13 (%31.70)	3 (%7.31)	10 (%24.39)	0.1580
	Skor 1	2 (%4.87)	7 (%17.07)	4 (%9.75)	
	Skor 2	0 (%0)	1 (%2.43)	1 (%2.43)	
Wnt 5a	Skor 0	9 (%21.95)	1 (%2.43)	4 (%9.75)	0.0793
	Skor 1	4 (%9.75)	7 (%17.07)	9 (%21.95)	
	Skor 2	2 (%4.87)	3 (%7.31)	2 (%4.87)	

Chi-square testi kullanılmıştır.

* Gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark ($p < 0.001$)

β -catenin K grubu için epitelyal dokuda intranükleer boyanma yoğunluğu sıklıkla 0 skoruna sahiptir. Wnt 10b için epitelyal dokuda intranükleer boyanma yoğunluğu K grubu için intrastoplazmik boyanma ile benzerlik göstermektedir. β -catenin ve Wnt 10b GAP ve GKP örneklerinde ise hafif yoğunlukta boyanma göstermiştir. Wnt 5a skoru her iki hastalık grubu için de 1'dir.

Çizelge 3.6. İmmunohistokimyasal Boyama Sonucunda Antijenlerin Epitelyal Dokuda İntranükleer Boyanma Yüzdelerinin Gruplar Arası Karşılaştırması

		Kontrol (n=15)	Generalize Agresif Periodontitis (n=11)	Generalize Kronik Periodontitis (n=15)	P
β -catenin	Skor 0	8 (%19.51)	3 (%7.31)	5 (%12.19)	0.1063
	Skor 1	7 (%17.07)	5 (%12.19)	9 (%21.95)	
	Skor 2	0 (%0)	3 (%7.31)	1 (%2.43)	
Wnt 10b	Skor 0	13 (%31.70)	4 (%9.75)	6 (%14.63)	0.0925
	Skor 1	2 (%4.87)	6 (%14.63)	8 (%19.51)	
	Skor 2	0 (%0)	1 (%2.43)	1 (%2.43)	
Wnt 5a	Skor 0	8 (%19.51)	4 (%9.75)	5 (%12.19)	0.7267
	Skor 1	4 (%9.75)	5 (%12.19)	7 (%17.07)	
	Skor 2	3 (%7.31)	2 (%4.87)	3 (%7.31)	

Chi-square testi kullanılmıştır.

* Gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark ($p < 0.001$)

β -catenin bağ dokusunda sıklıkla intrastoplazmik boyanırken en yoğun GKP grubunda izlenmiştir (Çizelge 3.7. ve 3.8.). Wnt 10b GKP grubunda intranükleer boyanma gösterirken GAP grubunda intrastoplazmik boyanma göstermiştir. Wnt 5a her iki hastalık grubunda K grubuna göre daha yoğun boyanmakla birlikte GAP grubunda intrastoplazmik boyanma ,GKP grubunda ise intranükleer boyanma gözlenmiştir.

Çizelge 3.7. İmmunohistokimyasal Boyama Sonucunda Antijenlerin Bağ Dokusunda İntrastoplazmik Boyanma Yüzdelерinin Gruplar Arası Karşılaştırması

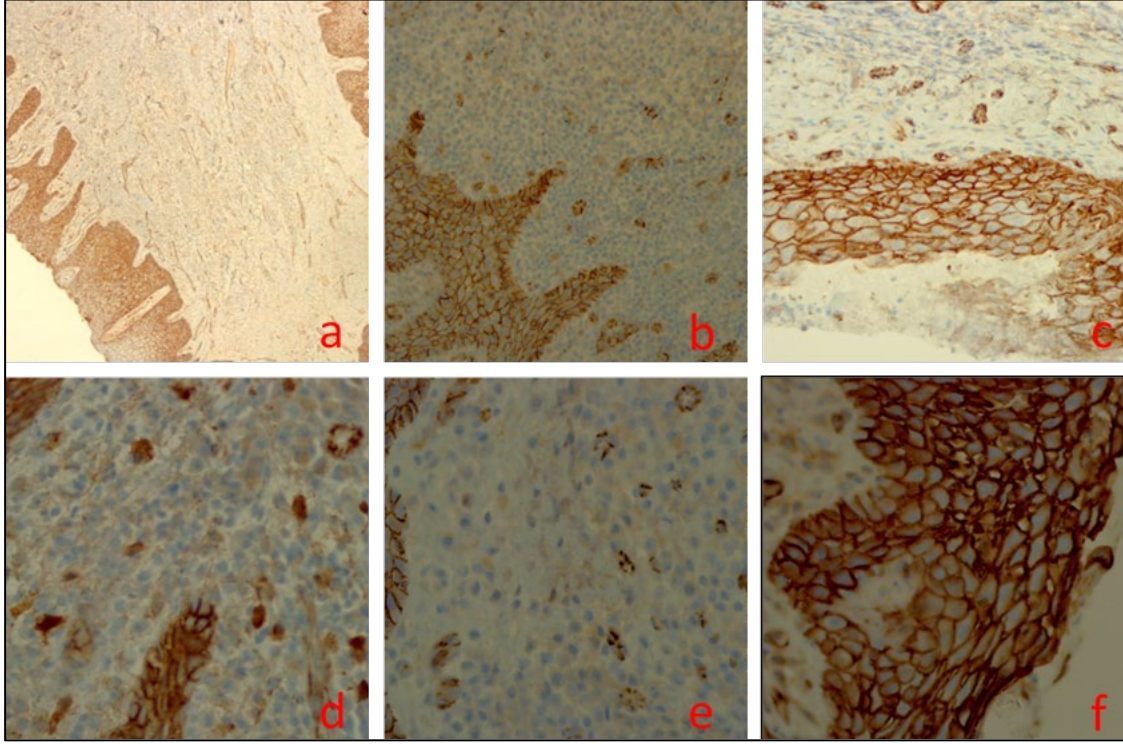
		Kontrol	Generalize Agresif	Generalize Kronik	p
		(n=15)	Periodontitis	Periodontitis	
		(n=11)	(n=15)		
β-cathenin	Skor 0	5 (%12.19)	2 (%4.87)	2 (%4.87)	0.7171
	Skor 1	8 (%19.51)	6 (%14.63)	5 (%12.19)	
	Skor 2	2 (%4.87)	3 (%7.31)	8 (%19.51)	
Wnt 10b	Skor 0	8 (%19.51)	2 (%4.87)	9 (%21.95)	0.5121
	Skor 1	6 (%14.63)	7 (%17.07)	5 (%12.19)	
	Skor 2	1 (%2.43)	1 (%2.43)	1 (%2.43)	
Wnt 5a	Skor 0	8 (%19.51)	0 (%0)	3 (%7.31)	0.0047*
	Skor 1	6 (%14.63)	3 (%7.31)	7 (%17.07)	
	Skor 2	1 (%2.43)	8 (%19.51)	5 (%12.19)	
Chi-square testi kullanılmıştır.					
* Gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark (p<0.001)					

Çizelge 3.8. İmmunohistokimyasal Boyama Sonucunda Antijenlerin Bağ Dokusunda İntranükleer Boyanma Yüzdelерinin Gruplar Arası Karşılaştırması

		Kontrol	Generalize Agresif Periodontitis	Generalize Kronik Periodontitis	p
		(n=15)	(n=11)	(n=15)	
β-cathenin	Skor 0	7 (%17.07)	4 (%9.75)	7 (%17.07)	0.8254
	Skor 1	7 (%17.07)	6 (%14.63)	7 (%17.07)	
	Skor 2	1 (%2.43)	1 (%2.43)	1 (%2.43)	
Wnt 10b	Skor 0	9 (%21.95)	7 (%17.07)	4 (%9.75)	0.1118
	Skor 1	6 (%14.63)	4 (%9.75)	7 (%17.07)	
	Skor 2	0 (%0)	0 (%0)	4 (%9.75)	
Wnt 5a	Skor 0	14 (%34.14)	2 (%4.87)	5 (%12.19)	0.0028*
	Skor 1	1 (%2.43)	6 (%14.63)	9 (%21.95)	
	Skor 2	0 (%0)	3 (%7.31)	1 (%2.43)	
Chi-square testi kullanılmıştır.					
* Gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark (p<0.001)					

β-catenin GAP grubunda esas olarak endotel ve epitelde boyanmakta olup bağ dokusu için boyanma şiddeti epitelde daha düşüktür. K grubunda, hücre-hücre

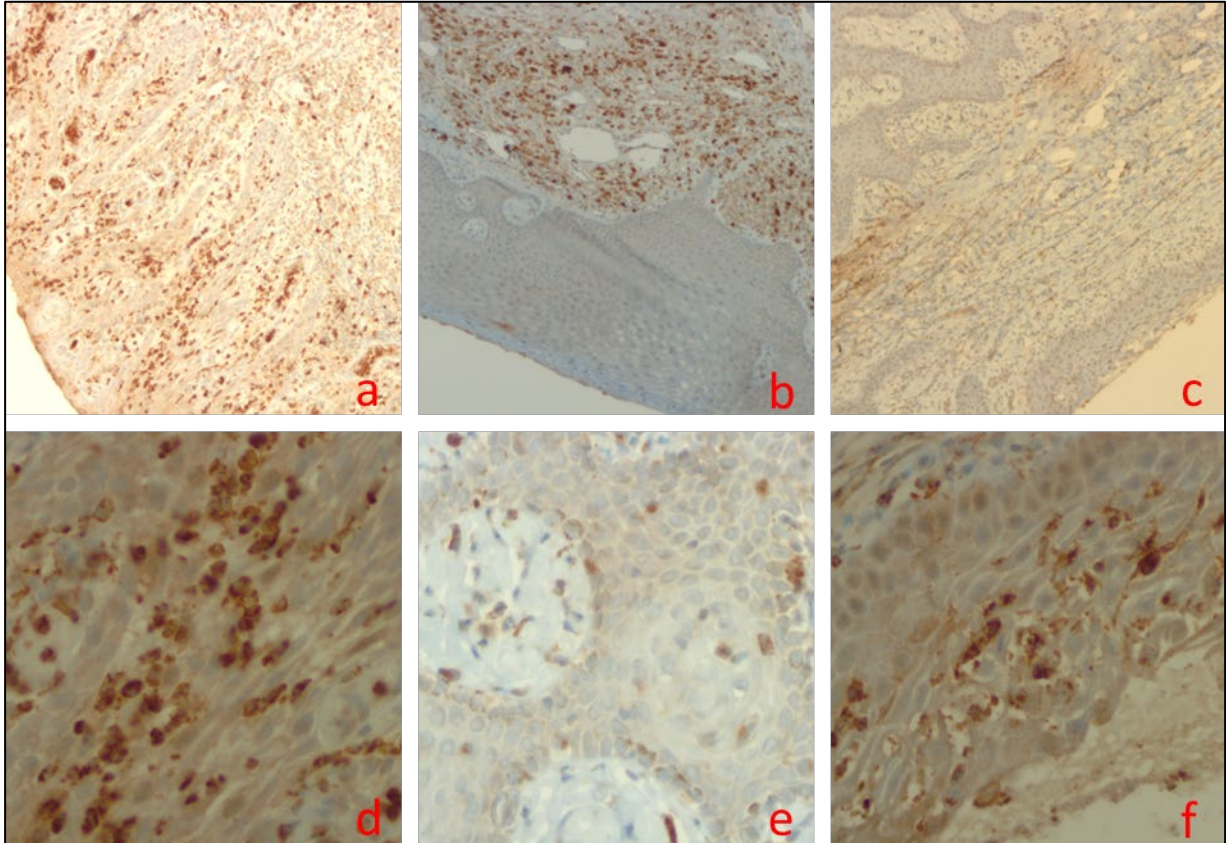
bağlantısında görevli olduğu için özellikle epitel hücre çeperinde boyanmakta olup inflamatuvar hücrelerdeki boyanması oldukça düşük yoğunluktadır. GKP grubunda ise hem epitel hem de bağ dokusu için hafif boyanma göstermiştir (Şekil 3.2.).



a:K grubu x40; b:GAP grubu x200; c: GKP grubu x200; d: K grubu x400; e: GAP grubu x400; f: GKP grubu x400
Şekil 3.2. β -catenin boyanma yoğunlukları

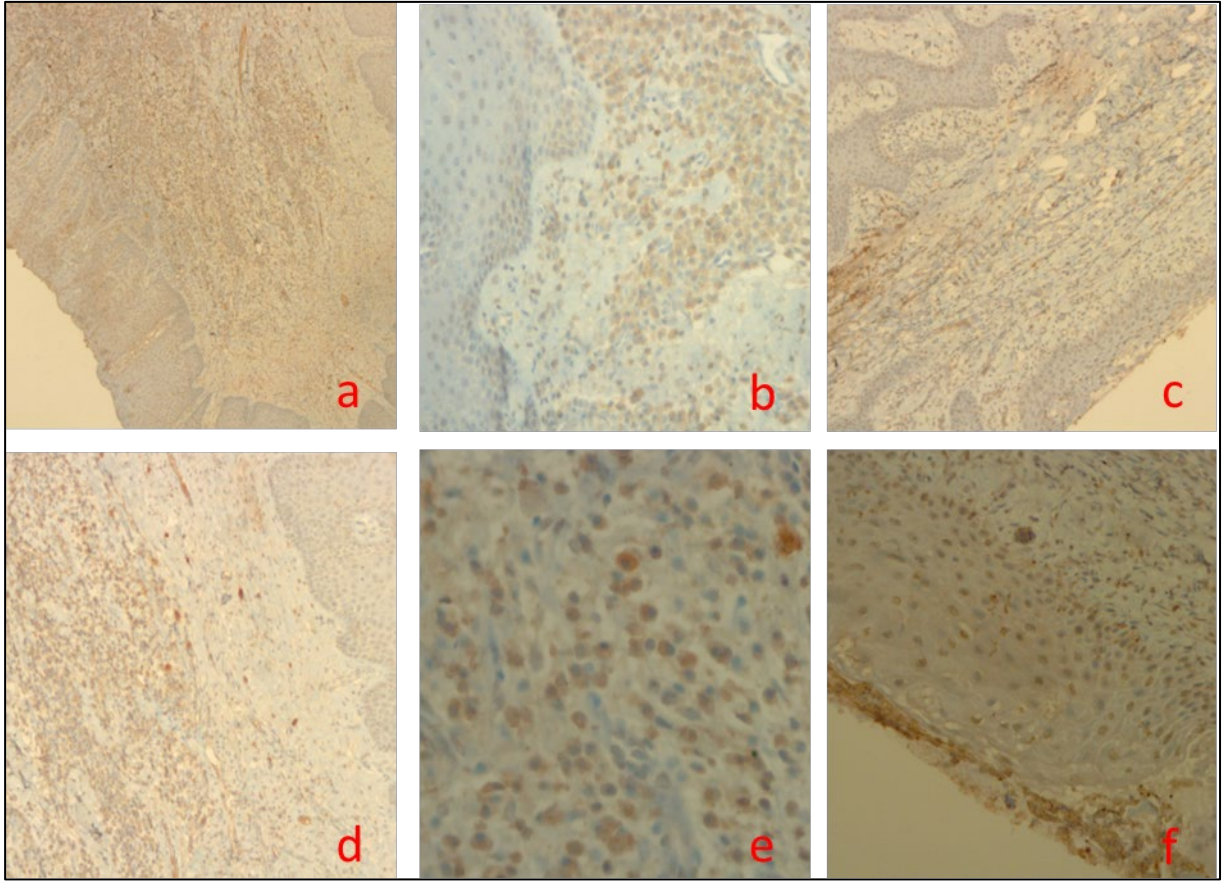
Wnt 5a GAP örneklerinde bağ dokuda daha güçlü boyanma göstermiştir. Epitelin basalinde bir miktar boyanma gözlenmekte olup langerhans hücreleri gibi

savunma hücrelerinde daha yoğun boyanmaktadır. Kontrol örneklerinde ise epitelde daha yoğun olarak boyanmıştır. GKP grubundaki boyanma yoğunluğu GAP grubundan daha düşük olup epiteldeki boyanma bağ dokusundan daha yoğundur (Şekil 3.3.).



a:K grubu x100; b:GAP grubu x100; c: GKP grubu x100; d: K grubu x400; e: GAP grubu x400; f: GKP grubu x400
Şekil 3.3. Wnt 5a boyanma yoğunlukları

Wnt 10b GAP örneklerinde çoğunlukla bağ dokusunda boyanmaktadır. Kontrol örneklerinde bağ dokusunda hafif şiddette boyanma gösterirken, epitel dokuda boyanma gözlenmemiştir. GKP grubundaki boyanma ise sıklıkla basal membran seviyesindedir (Şekil 3.4.).



a:Kontrol grubu x40; b:GAP grubu x200; c: GKP grubu x100; d: Kontrol grubu x400; e: GAP grubu x400; f: GKP grubu x200
Şekil 3.4. Wnt 10b boyanma yoğunlukları

3.5. PCR Verileri ile Klinik Periodontal Verilerin Korelasyonu

Tüm ağız ve bölgeye özgü klinik periodontal parametreler birbirleri ile güçlü korelasyon göstermektedir ($r>0.6$) (Çizelge 3.9.). Wnt 3a ile Pİ ve Gİ ile orta şiddette korelasyon gözlenmektedir. Wnt 5a; Pİ, Gİ ve Wnt 3a ile orta şiddette korelasyon göstermektedir. Runx2 Gİ ile güçlü; Pİ, SD, Wnt 3a ve Wnt 5a ile orta şiddette; BOP ve KAK ile düşük korelasyon göstermektedir. Wnt 10b tüm klinik periodontal parametrelerle güçlü korelasyon gösterirken, Wnt 3a ve Runx2 ile orta şiddette, Wnt 5a ile düşük korelasyon göstermektedir. TNF- α BOP ve SD ile düşük, diğer parametreler ile orta şiddette korelasyon göstermektedir. β -catenin ekspresyonu diğer parametrelerle negatif korelasyon göstermekte olup SD, BOP, KAK, TNF- α ve bölgeye özgü klinik parametreler ile orta şiddette, Pİ ve Runx2 ile düşük derecede ilişkilidir.

Çizelge 3.9. Klinik Periodontal Parametreler ile Wnt 3a, Wnt 5a, Wnt 10b, β -catenin, Runx2 ve TNF- α PCR Sonuçlarının Korelasyonu

Parametreler	GI	SD	BOP	KAK	Wnt 3a	Wnt 5a	Runx2	Wnt 10b	TNF- α	β -catenin	Pİ (Bölgeye özgü)	Gİ (Bölgeye özgü)	BOP (Bölgeye özgü)	SD (Bölgeye özgü)
Pİ	0,807**	0,635**	0,702**	0,659**	0,301**	0,330**	0,317*	0,598**	0,355*	-0,297*	0,698**	0,670**	0,702**	0,659**
Gİ		0,648**	0,666**	0,688**	0,426*	0,475**	0,463**	0,652**	0,574*	-0,277	0,605**	0,559**	0,713**	0,696**
SD			0,916**	0,950**	0,338	0,253*	0,304*	0,714**	0,429*	-0,362*	0,803**	0,779**	0,874**	0,812**
BOP				0,906**	0,335	0,419*	0,311	0,742**	0,491*	-0,491*	0,865**	0,879**	0,950*	0,904*
KAK					0,287	0,236*	0,208	0,722*	0,461**	-0,386*	0,825**	0,757**	0,877**	0,793**
Wnt 3a						0,412*	0,576**	0,433**	0,552*	-0,067	0,144	0,215	0,434*	0,419*
Wnt 5a							0,349*	0,444*	0,394*	-0,191*	0,345*	0,386*	0,542**	0,570**
RunX2								0,309*	0,445*	-0,232*	0,149	0,255	0,365*	0,423*
Wnt 10b									0,431*	-0,180	0,718**	0,695**	0,788**	0,718**
TNF- α										-0,389*	0,383*	0,399*	0,532*	0,552**
β -catenin											-0,450*	-0,490*	-0,425*	-0,478*
Pİ (Bölgeye özgü)												0,949**	0,898**	0,754**
Gİ (Bölgeye özgü)													0,913**	0,789**
BOP (Bölgeye özgü)														0,906**

Spearman korelasyon testi, r.

*P < 0.005.

**P < 0.001.

r = 0.20–0.40 pozitif ve düşük korelasyon.

r = 0.40–0.60 pozitif ve orta dereceli korelasyon.

r = 0.60–0.80 pozitif ve güçlü korelasyon

4. TARTIŞMA

Periodontal hastalık tüm dünya nüfusunun %20-50'sini etkileyen yaygın immun-inflamatuvar bir hastalık olup (Sanz ve ark., 2010) Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre şiddetli periodontitis prevalansı %10'dur. Bu inflamatuvar proses diş yüzeyine tutunan biyofilm bakterileri tarafından başlatılır (Grove, 1982) ancak periodontal dokuların inflamasyonu ve destrüksiyonunun, büyük ölçüde duyarlı bir konağın gram-negatif bakteriyel patojen içeren biyofilme karşı yanıtından kaynaklandığı düşünülmektedir (Socransky ve Haffajee, 2005). Bakteriler periodontitisin patogenezinde bir başlatıcı unsur olmakla birlikte konak faktörleri, hastalığın ilerlemesinde önemli rol oynarlar (Bartold ve Van Dyke, 2013). Periodontitiste, inflamatuvar immün cevabın neden olduğu kemik yıkımı, inflamatuvar infiltrasyon ile kemik homeostazından sorumlu hücreler arasındaki "iki yönlü" etkileşimden kaynaklanmaktadır (Graves ve ark., 2011). Kemik metabolizmasının düzenlenmesi, sitokinler, kemokinler, hormonlar ve biyokimyasal stimülasyon dahil olmak üzere çeşitli lokal ve sistemik faktörlere bağlı olarak farklı sinyal iletim yollarının karmaşık bir işlemidir (Hofbauer ve Heufelder, 2001). Kemik oluşumu ile kemik yıkımı arasındaki bağlantıyı anlamak, periodontal hastalığın daha iyi anlaşılması ve tedavisi için çok önemlidir. Bu amaçla periodontitis patogenezinde immün inflamatuvar yolların koruyucu ve yıkıcı etkilerini anlamaya yönelik birçok çalışma yürütülmektedir. Hücre biyolojisi ile ilişkili olarak artan bilgilerimiz bu alanda araştırılmaya ihtiyaç duyulan birçok hücre sinyal yolağının varlığını vurgulamaktadır.

Periodontitis patogenezindeki bazı noktalar belirsizliğini korumakla birlikte son dönemde ilgi programlanmış hücre ölümüne kaymıştır. Abuhussein ve ark. 2014 yılında yaptıkları çalışmada kronik periodontitis hastalarından elde ettikleri DOS, tükürük ve serum örneklerinde apoptoz ilişkili markırların ekspresyonlarını değerlendirmişler ve periodontitis hastalarının DOS örneklerinde apoptotik hücre ölümünü kontrol eden caspas-3 ekspresyonunun arttığını ve cep derinliği ile pozitif korelasyon gösterdiğini ortaya koymuşlardır (Abuhussein ve ark., 2014).

Periodontal hastalıkta doku destrüksiyonu hastalığın doğası gereği patojen mikroorganizmalar üzerinden açıklanıyor olsa da Ebe ve ark. yaptıkları çalışmada doku yıkımının programlanmış hücre ölümü ve inflamatuvar cevabın bir sonucu olan DAMP salınımı ile de uyarıldığını göstermişlerdir (Ebe ve ark., 2011). Mori ve ark. 2015 yılında yaptıkları çalışmada, gingival epitel hücrelerinin ve fibroblastların, P. gingivalis LPS'nin bir ligandı olan TLR-2'nin ekspresyonunu arttırmak için TLR-3 yoluyla DAMP'ları tanıdıklarını göstermişlerdir (Mori ve ark., 2015). Royer ve ark. ise yaptıkları çalışmada epitelyal hücrelerin DAMP ve PAMP ile uyarılmasını takiben gelişen TLR-3 aktivasyonu ile hücre-hücre junctionlarının bozulduğu ve hücre membranından degrade olan β -catenin'in Wnt / β -catenin sinyal yolağının önemli bir aktivatörü olduğunu göstermişlerdir (Royer ve ark., 2017).

Standart Wnt sinyal yolu, önemli bir aracı olan β -catenin'in stabilitesini ve transkripsiyonel aktivitesini artırarak erken embriyogenez ve neoplazilerin gelişimi dahil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçleri düzenler (Polakis, 2000). Epitelyal hücreler, fibroblastlar, immun hücreler gibi birçok hücre tarafından eksprese edilen Wnt, ortam koşullarına bağlı olarak çeşitli genlerin ekspresyonlarını etkiler ve hücre içi sinyal yolları ile çapraz etkileşimde bulunur. Örneğin miyokardiyal fibroblastlar Wnt ile uyarıldığında, MMP-1 ve 13 aracılığıyla kardiyak fibroblast proliferasyonu artarken (Lin ve ark., 2016); sepsis indüklü akciğer hasarında MMP-7 üzerinden fibrozisi uyardığı gösterilmiştir (Villar ve ark., 2014). Aynı zamanda immun hücrelerin kemotaksisinde görevli olan Wnt proteinlerinin hücre migrasyonuna aracılık ettiği de bilinmektedir (Wu ve ark., 2007). Çalışmamızda değerlendirdiğimiz gingival doku örnekleri bağ dokusu, sulkus epiteli ve immun hücreleri içerdiğinden, farklı doku tiplerinin aynı hastalık koşulu altındaki davranışını değerlendirmek açısından oldukça önemlidir.

Periodontitis patogenezinde Wnt / β -catenin sinyal yolağı etkinliğini değerlendiren kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Ancak yapılan çalışmalar sıklıkla hücre kültürü çalışmaları olup doku ekspresyon seviyelerinin hastalık grupları arasında nasıl değişim gösterdiğini değerlendiren bir çalışma bulunmamaktadır. Biz çalışmamızda; generalize agresif periodontitisli, generalize kronik periodontitisli

hastalar ve sağlıklı gönüllülerden elde edilen doku örneklerini kullanarak, bu sinyal yolağının farklı hastalık antitelerinde nasıl davrandığını incelemeyi amaçladık. İmmunohistokimyasal analiz ile hem epitelyal dokuyu hem de bağ dokusunu ayrı ayrı değerlendirerek aynı koşullar altında farklı hücre tiplerinin davranışını saptamak ise çalışmamızın diğer önemli amacını oluşturmaktadır.

Tüm bu literatür bulgularının ışığında, periodontitis patogeneğinde Wnt / β -catenin sinyal yolağının etkinliğini değerlendirmek amacıyla biyopsi örneklerinde Wnt 3a, Wnt 5a, Wnt 10b, β -catenin, Runx2 ve TNF- α ekspresyonlarını RT PCR ile; Wnt 5a, Wnt 10b, β -catenin doku yoğunluklarını ise immunohistokimyasal analiz yöntemi ile değerlendirdik.

Çalışmamıza sistemik olarak sağlıklı generalize agresif periodontitis tanısı konulmuş 11, generalize kronik periodontitis tanısı konulmuş 15 ve periodontal açıdan sağlıklı 15 birey olmak üzere toplam 41 birey dahil edilmiştir.

Klinik periodontal indeksler açısından değerlendirildiğinde bütün parametreler hastalık gruplarında kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. BOP ve KAK değerleri GAP grubunda GKP grubundan daha düşük bulunmuştur. Bu durum GKP hastalarındaki artmış mikrobiyal yük miktarıyla ilişkili olarak klinik inflamatuvar yanıtın daha şiddetli olmasıyla ilişkilendirilebilir. (Armitage ve Cullinan, 2010). Loe ve arkadaşlarının 1965'teki öncü çalışmasından bu yana, dişeti iltihabının şiddeti ile supragingival ve subgingival plak akümüasyonu arasındaki anlamlı pozitif ilişki literatürde defalarca gösterilmiştir (Armitage ve ark., 1982; Demmer ve ark., 2008; Müller, 2009; Socransky ve ark., 1991 ve Trombelli ve ark., 2004;). Agresif periodontitisli birçok hastada, çok az diş taşı içeren veya hiç içermeyen, ince bir plak akümüasyonu vardır. Listgarten ve ark., o dönem için juvenil periodontitis olarak isimlendirilen ,1999 sınıflamasına göre agresif periodontitis olarak sınıflandırılan hastalık grubuna dahil edilen bireylerin periodontitis nedeniyle çekilen dişlerinde gerçekleştirdikleri elektron mikroskopik gözlemler ile, kök yüzeylerinin ince gram-negatif kokoid ve filamentöz bakteri birikintileri ile kaplandığını ortaya çıkarmışlardır (Listgarten ve ark., 1971). Aksine, kronik periodontitisli dişler, etkilenen kök

yüzeylerinde genellikle çok karmaşık ve kalın polimikrobiyal topluluklara sahiptir (Listgarten ve ark., 1971). Çalışmamızda mikrobiyolojik analiz yapılmamış olmakla beraber klinik gözlemlerimiz mevcut literatür verileri ile tutarlıdır. Benzer şekilde istatistiksel olarak anlamlı fark olmamakla beraber GKP grubu Pİ değerlerinin, GAP grubundan yüksek bulunmuş olması bakteri akümülyasyonu ile ilgili farklılığı ortaya koymaktadır (sırasıyla 1.74 ± 0.56 , 1.36 ± 0.55). GKP ve GAP gruplarının yaş ortalamaları sırası ile; 44.40 ± 9.37 ve 33 ± 5.52 olması nedeniyle, mevcut plak akümülyasyonunun doku üzerindeki zaman bağımlı destrüktif etkileri göz önünde bulundurularak BOP değerlerinde elde edilen farkın uzun süreli artmış mikrobiyal yükün inflamatuvar yanıtı şiddetlendirme yönündeki etkisiyle ilişkilendirmek mümkündür.

Periodontopatojenler ile karşı karşıya kalan konağa ait immün yanıt, sıklıkla periodontal bağ doku harabiyetine ve alveolar kemik rezorpsiyonuna yol açan bir dizi inflamatuvar reaksiyonu tetikler (Stadler ve ark., 2016). TNF- α , bu süreçlerle ilgili anahtar bir sitokin olarak kabul edilir (Santos ve ark., 2010 ve Tervahartiala ve ark., 2001) ve periodontopatojen bakterilere karşı gelişen doğal immün yanıtta kritik bir rol oynamaktadır (de Oliveira ve ark., 2009). Madureira ve ark. 2018 yılında yaptıkları sistematik derlemede TNF- α 'nın periodontal hastalık için diagnostik değerini incelemek amacıyla 688 çalışma incelemişler ve bunların arasından 9 çalışmayı seçerek değerlendirmişlerdir (Madureira ve ark., 2018). Yaptıkları değerlendirme sonucunda, elde edilen verilerin, kontrol ve / veya sağlıklı bölgelere kıyasla farklı periodontal hastalık formlarına sahip hastaların DOS'unda artmış TNF- α seviyelerini gösterdiğini ortaya koymuşlardır. DOS'taki TNF- α seviyeleri ile farklı periodontitis tipleri arasında hiçbir korelasyon bulunamamasına rağmen, bu molekülün periodontal yıkımın şiddeti ile güçlü bir korelasyon gösterdiği ve hastalığın farklı evrelerini karşılaştırmak için kullanılabilir olduğu sonucuna varmışlardır. Benzer şekilde bizim çalışmamızın sonucunda da TNF- α ekspresyonu hastalık gruplarında kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur, ancak hastalık grupları arasında herhangi bir fark elde edilmemiştir. TNF- α tüm klinik periodontal parametreler ile pozitif korelasyon göstermekte olup, bu durum; molekülün her iki hastalık grubu tarafından da kullanılan ortak bir molekül olduğu ve hastalık şiddetiyle

ilişkili olduğunu destekler niteliktedir. Aynı zamanda bu molekülün sağlıklı gruplara göre yüksek oranda eksprese edilmesi; çalışmaya dahil edilen hastaların, hastalığın aktif yıkım fazında olduğunu destekler nitelikte bir bulgudur. Benzer şekilde Zhang ve ark. 2016 yılında yaptıkları çalışmada agresif ve kronik periodontitis hastaları arasında TNF- α seviyesini değerlendirmişlerdir (Zhang ve ark., 2016). Çalışma sonucunda agresif ve kronik periodontitis hastalarında TNF- α seviyesinin kontrol grubundan yüksek olduğunu ve hastalık grupları arasında fark olmadığını göstermişlerdir. Ayrıca çalışmada cep derinliği arttıkça ekspresyon miktarının arttığını, bu nedenle bu molekülün hastalığın şiddetini gösteren önemli bir belirteç olduğu sonucuna varmışlardır. Çalışma grupları arasında tüm ağız ve bölgeye özgü cep derinlikleri açısından fark olmaması ve elde edilen değerlerin şiddetli periodontitis ile uyumlu olması TNF- α 'nın hastalık tipinden ziyade şiddeti ile uyumlu olduğu fikrini desteklemektedir.

β -catenin RT PCR sonuçları; GAP için 0.6 ± 0.3 , GKP için 0.7 ± 0.5 , K grubu için 1 ± 0.3 olarak bulunmuştur. Her iki hastalık grubu arasında fark olmamakla birlikte K grubunda hastalık grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek seviyede eksprese edilmiştir. İmmunohistokimyasal analiz yöntemiyle yapılan değerlendirme sonucunda β -catenin GAP grubunda esas olarak endotel ve epitelde boyanmakta olup bağ dokusu için boyanma şiddeti epitelde daha düşüktür ve epitel dokuda sıklıkla intranükleer boyanma mevcuttur. GKP grubunda ise hem epitel hem de bağ dokusu için hafif boyanma göstermiştir ve sıklıkla intranükleer boyanma izlenmiştir. Kontrol grubunda sıklıkla epitel dokuda boyanma skoru 2 olup, hücre-hücre bağlantısında görevli olduğu için özellikle epitel hücre çeperinde yoğunlaşmıştır ve inflamatuvar hücrelerdeki boyanması düşük yoğunluktadır. β -catenin esas olarak hücre-hücre bağlantısında görev alan bir proteindir ve aynı zamanda hücre içi sinyal molekülü olarak görev yapar. Wnt / β -catenin sinyal yolağının hücre içi transüdüğü olarak görev yapan β -catenin sinyal yolu aktif durumda iken öncelikle sitoplazmada birikir, daha sonra da çekirdeğe girerek hedef genlerin transkripsiyonunu sağlar. Dolayısıyla bu durumda hücre zarının yanı sıra sitoplazma ve çekirdekte de β -catenin birikimi gözlenir (Willert ve ark., 2006). Meng ve Takeichi ,Wnt sinyalizasyonunun yokluğunda cadherin bağımlı hücre-hücre bağlantılarının bir bileşeni olarak β -catenin' in, hücre

membranının stoplazmik kısmında yer aldığını bildirmişlerdir (Meng ve Takeichi, 2009). İmmunohistokimyasal analiz sonucunda K grubunda epitel hücre çeperinde yoğun olarak boyanması Meng ve Takeichi'nin gözlemleri ile uyumludur. Wnt gibi çeşitli sinyal molekülleri ile hücre çeperinden serbestleşen β -catenin'in kaderi kinazlar tarafından belirlenir. Serbest kalan β -catenin Axin ve APC gibi yıkıcı kompleksin scaffold molekülleri tarafından fosforile edilebilir, nukleusa translokasyon gösterebilir, çeşitli transkripsiyonel regülatör proteinler aracılığı ile degrade edilebilir. Overeksprese β -catenin'in neoplastik gen ekspresyonunu engellemek için çeşitli hücre içi negatif feedback mekanizmaları mevcuttur. Wnt / β -catenin sinyal yolağının aktivasyonunda aşırı gen ekspresyonunu engellemek için hücrenin kullandığı sistemlerden biri de β -catenin'in intranukleer degradasyonudur (Topol ve ark., 2009). Çalışmamız sonucunda, hastalık grubunda artmış Wnt 3a ekspresyonuna bağlı olarak β -catenin seviyesinin de artması beklenirken daha düşük ekspresyon seviyesine sahip olması bu durumla ilişkili olabilir. Her iki hastalık grubunda da hem bağ dokusunda hem epitelyal dokuda intranukleer boyanma oranının intrastoplazmik boyanma oranından fazla olması ve kontrol grubunda sıklıkla hücre çeperinde izlenmesi bu yolağın periodontitis ile aktive olduğunu göstermektedir. İtranukleer boyanmanın intrastoplazmik boyanmadan fazla olması β -catenin'in yıkıcı kompleksten ayrılarak nukleusa translokasyon gösterdiğini ortaya koymaktadır. Ancak PCR değerlerinin düşük olması bu molekülün nukleusta degradasyona uğramasıyla ilişkili olabilir.

Aberrant Wnt sinyali, hem insanlarda hem de hayvanlarda geniş bir yelpazede patolojik değişikliklerin temelini oluşturur (Clevers, 2006; Nusse ve Clevers, 2017). Bu nedenle ekspresyonu çeşitli hücre içi mekanizmalarla sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. NF- κ B ve Wnt / β -catenin sinyal yolları, hem yolak üzerinden hem de hedef genlerin işlevleri üzerinden birbirlerini etkileşimli olarak düzenlerler (Kavitha ve ark., 2013; Ma ve ark., 2015 ve Ma ve Hottiger, 2016). Dokulardan organlara kadar karakterize edilen karmaşık çapraz etkileşimler, kanser, inflamatuvar ve immün hastalıklar gibi çeşitli klinik hastalıkların oluşumunu ve gelişimini etkiler. Pei ve ark. 2017 yılında yaptıkları çalışmada NF- κ B sinyal yolağı inhibisyonunun inflamatuvar yanıtı baskıladığı Wnt yolunu ve ardından osteogenez ve anjiyogenez aynı anda

upregüle ettiğini göstermişlerdir (Pei ve ark., 2017). Tarapore ve ark. da benzer şekilde inflamatuvar sinyallerin NF- κ B'yi uyararak β -catenin'i ve Runx2'yi inhibe ettiğini ve matris proteinlerinin ekspresyonunu azalttığını göstermişlerdir (Tarapore ve ark., 2016). Liu ve ark. bir fare ortopedik çalışmasında, osteoporoz için tekli bir terapötik ajan uygulamasında, Wnt / β -catenin yolu ile kemik oluşumunun uyarıldığını ve NF- κ B inhibisyonu ile rezorpsiyonun engellendiğini göstermişlerdir (Liu ve ark., 2016). Zhao ve ark. ise doğrudan NF- κ B'nin inhibisyonunun, inflamatuvar sitokin salınımını düzenlediğini, osteoblast farklılaşmasını arttırdığını ve Wnt3a / β -catenin yolunu uyardığını göstermişlerdir (Zhao ve ark., 2016). Periodontoloji alanında bu etkileşimi gösteren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak benzer inflamatuvar mekanizmaların etkili olduğu romatoloji çalışmalarında ciddi veriler ortaya konulmuştur. İnflamatuvar bir hastalık olan periodontitiste, proinflamatuvar gen ekspresyonunun merkezi kontrolörlerinden biri olan NF- κ B'nin oldukça etkili olduğu bilinmektedir (Arabacı ve ark., 2010; Boyce, 2013; Darveau, 2010; Graves ve ark., 2011; Hajishengallis, 2014 ve Valerio ve ark., 2014). Epizodik karaktere sahip olan periodontitiste yıkım fazında proinflamatuvar yanıt baskınken yapım fazında antiinflamatuvar mekanizmalar öne çıkmaktadır. TNF- α ekspresyonu ile hastalığın aktif fazında olduğu düşünülen hastaların çalışmaya dahil edildiği göz önünde bulundurulduğunda hastalarda proinflamatuvar mekanizmanın baskın olduğu söylenebilir. Çalışmamızda NF- κ B düzeyleri değerlendirilmemiş olmakla birlikte iki yolak arasındaki bu çapraz etkileşim artmış Wnt ekspresyonuna rağmen azalmış β -catenin ekspresyonunu açıklayabilir.

Çalışmamızdan farklı olarak Zhu ve ark., 2019 yılında yaptıkları çalışmada kronik periodontitis hastalarının doku ve DOS örneklerinde β -catenin ekspresyonunun arttığını göstermişler ve feedback mekanizmaları göz önünde bulundurulduğunda yolağın zaman bağımlı değişimini değerlendirmemelerini çalışmanın kısıtlılığı olarak vurgulamışlardır (Zhu ve ark., 2019). Aynı şekilde bizim de yolağın zaman bağımlı değişimini incelemememiz, çalışmamızın kısıtlılıklarıdır. Bu yönde yapılacak ileri çalışmalar ile belki de bu yolağın epizodik aktivasyona sahip olduğu ve hastalığın farklı fazlarında farklı aktivite gösterdiği ile ilişkin yeni yorumlar ortaya konulabilecektir.

Wnt 3a, β -catenin bağımlı sinyal yolağı üzerinden etki gösterip reseptör aktivasyonu; büyüme faktörleri (örn., Vasküler endotelyal büyüme faktörü; VEGF), hücre dışı matris (ECM) proteinleri (örn., Fibronektin), matris metaloproteinazlar (MMP) ve sitokinler (örneğin, IL-8) dahil olmak üzere doku onarımı ve remodelasyonunda rol alan Wnt hedef genlerinin β -catenin aracılı transkripsiyonu ile sonuçlanır (Clevers, 2006). Çalışmamız sonucunda Wnt 3a RT PCR değerleri, kontrol grubu için 0.98 ± 0.28 , GAP grubu için 3.51 ± 1.76 ve GKP grubu için 1.59 ± 1.03 olarak bulunmuştur. Her iki hastalık grubunda da kontrol grubundan yüksek oranda eksprese edilmiş olup, hastalık grupları arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Wnt 3a'nın periodontitis patogenezindeki aktivitesini değerlendiren tek çalışma Liu ve arkadaşlarına aittir ve çalışma sonuçları çalışmamızla benzerlik göstermektedir (Liu ve ark., 2018). Bu çalışmada kronik periodontitis tanısı konulmuş hastalardan elde edilen doku örneklerinde Wnt 3a düzeyi immunohistokimyasal analiz ile değerlendirilmiş ve hastalık grubunda daha yüksek skor elde edilmiştir. Wnt 3a osteogenik diferansiasyonda potent regülatördür (Baksh ve ark., 2007; Leclerc ve ark., 2008), gelişim döneminde ve sonrasında osteojenik dokunun düzenlenmesinde görevlidir (Takada ve ark., 1994) ve mezenşimal kök hücre proliferasyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Periodontal hastalıklar her ne kadar epizodik olarak tanımlansa da yapım ve yıkım mekanizmalarının devamlı aktivasyonu söz konusudur. Hangi mekanizmanın öne çıktığı hastalığın yıkım ya da yapım dönemini belirlemektedir. Hastalık süresince proinflatuar mekanizmalar aracılığıyla kemik yıkım prosesi aktif olmakla birlikte bu yıkımı kompanse etmek adına yapım mekanizmaları da aktiftir. “Buttressing bone formation” olarak da bilinen kemik oluşum alanları, aktif kemik rezorpsiyonu bölgelerinin hemen bitişiğinde ve kalan kemiği güçlendirmek için meydana gelir ve hastalık süresince aktif kemik yapımının da devam ettiğinin en önemli göstergelerinden biridir. Bu osteojenik yanıt, hayvanlarda deneysel olarak üretilen periodontal kemik kaybında açıkça gözlenmektedir (Carranza ve ark., 1971). İnsanlarda bu daha az açıktır, ancak histometrik (Carranza, 1967; Carranza ve Cabrini, 1967) ve histolojik çalışmalarla doğrulanmıştır (Glickman ve Smulow, 1965). Bu veriler ışığında bu bölgedeki kemik apozisyonu için mezenşimal kök hücre diferansiasyonunun gerekliliği de göz önünde bulundurulduğunda Wnt 3a'nın hastalık gruplarında yüksek bulunması beklenmedik değildir. Ayrıca Wnt 3a bölgeye özgü

BOP skoru ve TNF- α ile düşük derecede korelasyon göstermektedir ki bu durum hastalık patogenezi ile ilişkisini vurgulayan önemli bir bulgudur. Agresif periodontitiste konak yıkım mekanizmalarının kronik periodontitise göre daha aktif olması bu alanda koruma mekanizmalarının da daha aktif olmasını gerektirebilir. Bu durum, WNT 3a ekspresyonunun GAP grubunda GKP grubundan istatistiksel anlamlı yüksek olmasını açıklayabilir.

Çalışmamız Wnt 5a RT PCR sonuçları kontrol grubu için 1 ± 0.22 , GAP için 3.04 ± 1.5 ve GKP için 1.7 ± 0.3 'tür. İlk olarak 2012 yılında Nanbara ve ark., kronik periodontitiste Wnt 5a ekspresyonunun arttığını göstermişlerdir (Nanbara ve ark., 2012). Daha sonra yapılan çeşitli çalışmalar da aynı sonucu desteklemiştir (Divaris ve ark., 2013; Maekawa ve ark., 2017). Ancak bizim çalışmamız bu molekülün agresif ve kronik periodontitis arasındaki farkını inceleyen ilk çalışmadır. Çalışmamız sonucunda diğer çalışmalarla benzer olarak hastalık gruplarında kontrol grubundan daha yüksek ekspresyon elde ederken GAP grubunda GKP grubundan daha yüksek bir ekspresyon oranı saptadık. Wnt 5a aktive antijen sunucu hücreler tarafından sentezlenir ve ekspresyonu, insan antijen sunan hücrelerde mikobakteriyel hücre duvarı bileşenleri ve endotoksin tarafından indüklenir (Blumenthal ve ark., 2006) ve Wnt5a sinyali, sepsis sırasında insan makrofajlarının genel inflamatuvar yanıtı için gereklidir (Pereira ve ark., 2008). Wnt 5a ekspresyonu, TLR sinyaline ve insan antijen sunan hücrelerde merkezi inflamatuvar regülatör NF- κ B'nin aktivasyonuna bağlıdır (Blumenthal ve ark., 2006). Wnt 5a, hücre içi ikincil haberci olarak β -catenin yerine Ca^{++} u kullanır. Bu nedenle standart olmayan Wnt sinyal yolağının aktivatörü olan Wnt 5a, Wnt / β -catenin sinyal yolağını reseptör bağımlı olarak aktive ya da deaktive edebilir (Leris ve ark., 2005). Wnt 5a, RANKL ile indüklenen osteoklastogenezi artırarak kemik oluşumunu inhibe eder (Maeda ve ark., 2012) ve Wnt 5a'nın upregülasyonu, NF- κ B sinyal yolu aracılığıyla hücre içi reaktif oksijen türlerinin ekspresyonunu da artırabilir (Zhao ve ark., 2015). Zhao ve ark. ise 2017 yılında yaptıkları çalışmada NF- κ B sinyal yolağı inhibisyonunun Wnt 3a / β -catenin sinyal yolağının aktivasyonuna neden olduğunu göstermişlerdir (Zhao ve ark., 2017). Bu iki araştırma sonucu birlikte değerlendirildiğinde Wnt 3a ile Wnt 5a arasındaki etkileşimin kemik homeostazisi için gerekli olduğu sonucuna varılabilir. Bu nedenle

artmış Wnt 5a ekspresyonuna bağılı olarak gelişen doku destruksiyonunu sınırlandırmak adına Wnt 3a ekspresyonunun artmış olabileceğı sonucuna varılabilir.

Artese ve ark., 2011 yılında yaptıkları çalışmada agresif ve kronik periodontitis hastalarında immun hücre aktivasyonlarını değerlendirmişler ve çalışma sonucunda kronik periodontitis hastalarında yardımcı T hücreleri ve sitotoksik T hücreleri baskın iken, agresif periodontitis hastalarında bunlara ilaveten plasma hücreleri ve makrofajların da aktif olduğunu göstermişlerdir (Artese ve ark., 2011). Çalışmamız sonucunda makrofaj kaynaklı cevapta görevli olan Wnt 5a ekspresyonunun GAP grubunda GKP grubundan yüksek olması Artese ve arkadaşlarının bulgularını desteklemektedir. İmmunohistokimyasal analiz ile de özellikle GAP'a ait örneklerde savunma hücrelerinde boyanma elde edilmiş, GKP grubunda ise sıklıkla bağ dokuda boyanma gözlenmiştir. Wnt 5a immun yanıtta görevli olup, periodontitis patogeneğinde önemli yollardan biri olan NF-κB ile çapraz etkileşim göstermektedir. Etkinliğinin β-catenin'den bağımsız olması hastalık grubunda β-catenin ekspresyonu düşük bulunmasına rağmen Wnt 5a ekspresyonunun yüksek olması ile uyumludur.

Chatzopoulos ve ark. yaptıkları çalışmada kronik periodontitis teşhisi konulan hastalardan aldıkları DOS örneklerinde Wnt 5a protein seviyesini ve hastalık şiddetiyle protein seviyesi arasındaki ilişkiyi değerlendirmişler ve Wnt 5a'nın hasta bireylerde kontrol örneklerine göre artmış ekspresyon gösterdiğini, diğer taraftan hastalık şiddeti ile korelasyon göstermediğini bulmuşlardır (Chatzopoulos ve ark., 2019). Biz çalışmamızda Wnt 5a'nın örneklem bölgesindeki BOP skoru ile güçlü, tüm ağız BOP skoru ve TNF-α ekspresyonu ile düşük korelasyon gösterdiğini bulduk. Bölgeye özgü BOP skorunun yüksek olması, değerlendirilen dokuların aktif hastalık fazındaki bölgelerden elde edildiğini gösteren önemli bir bulgudur. Bu nedenle Wnt 5a'nın periodontitis şiddeti ile ilişkili bir markır olduğu söylenebilir.

Hem GAP hem de GKP gruplarında Wnt 5a ekspresyon kat sayısı Wnt 3a ekspresyon katsayısından yüksek olmakla birlikte her iki molekül de hastalık gruplarında K gruplarından yüksek bulunmuştur. Destruktif hastalığın patofizyolojisi

nedeniyle proinflamatuvar mekanizmaların antiinflamatuvar mekanizmalara göre baskın olması öngörülebilir bir sonuçtur. Normal şartlar altında yollar arasındaki çapraz etkileşim doku homeostazisi açısından önemli olmakla birlikte hastalığa bağlı değişen mikroçevre de her iki yolağı birden etkilemektedir. DAMP ve PAMP tarafından başlatılan inflamatuvar proses, immün hücre aktivasyonuna neden olmakta ve proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu arttırmaktadır. Buna bağlı olarak sepsis kaynaklı makrofaj cevabının önemli mediatörlerinden biri olan Wnt 5a'nın ekspresyonu artmaktadır. Artmış Wnt 3a ekspresyonunun, Wnt 5a ekspresyonuna bağlı olarak konak kaynaklı doku harabiyetini sınırlandırmak için hücre proliferasyonunda aktif rol oynaması nedeniyle geliştiği şeklinde yorumlanabilir.

Halleskog ve ark. mikrogliya hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmada Wnt 3a ve Wnt 5a'nın aynı reseptör üzerinden aktivite gösterdiklerini ortaya koymuşlardır (Halleskog ve ark., 2011). Mikrogliya hücrelerinin Wnt 3a veya Wnt 5a ile uyarılması, proinflamatuvar sitokinlerin, kemokinlerin ve diğer immün yanıt genlerinin ekspresyonu ve proliferasyonuna neden olur (Halleskog ve ark. 2011, 2012; Halleskog ve Schulte 2013). Periferik makrofajlar üzerine yapılan çalışmalar ise, Wnt 3a ve Wnt 5a'nın proinflamatuvar yanıtı tetiklediğini göstermektedir (Pereira ve ark. 2009). Wnt 5a, mikobakteriyel türler, LPS'lere yanıt olarak upregüle edilir ve şiddetli sepsisli hastalarda makrofaj iletişimde kritik bir rol oynar (Blumenthal ve ark. 2006; Pereira ve ark. 2008). Öte yandan, periferik makrofajlarda Wnt'lerin anti-inflamatuvar etkileri de bildirilmiştir: Wnt-3a, reseptörü FZD1 ve Wnt / β -katenin yolu aracılığıyla mikobakteriyuma bağlı TNF- α ekspresyonunu azaltabilir (Neumann ve ark. 2010). Agresif periodontitis patogeneğinde makrofaj kaynaklı konak cevabının kronik periodontitisten daha belirgin olduğu (Artese ve ark., 2011) göz önünde bulundurulduğunda, Wnt 5a ekspresyonunun fazla olması öngörülebilir bir sonuç olarak göze çarpmaktadır. Bu veriler ışığında periodontitis patogeneğinde doku destruksyonu açısından standart olmayan Wnt sinyal yolağının Wnt / β -katenin sinyal yolağından daha aktif olduğu sonucuna varılabilir.

Standart Wnt / β -katenin sinyal yolağı, kemik apozisyonu ve remodelasyonu için kritiktir. Wnt sinyal yolu kemik gelişimi ve homeostazda önemli bir rol oynar. Bu

yolağın düzensizliği, kemik oluşumunu ve iyileşme sürecini büyük ölçüde engeller ve bu durum bu yolağın kemik rejenerasyonunda önemli bir role sahip olduğu hipotezini desteklemektedir (Chen ve Alman, 2009). Kemik gelişimi sırasında Wnt sinyalinin kesin mekanizması karmaşık bir mikro ortama bağlı olsa da, Wnt-3a, Wnt-5a, Wnt-7b ve Wnt-10b'nin osteoblast farklılaşmasının merkezi olduğunu gösterilmiştir (Leucht ve Helms, 2015). Çalışmamız sonucunda Wnt 10b RT PCR sonuçları kontrol grubu için 0.8 ± 0.3 , GAP grubu için 3.9 ± 1.86 , GKP grubu için 4.06 ± 1.63 'tür. Benzer şekilde Lima ve ark. 2017 yılında yaptıkları çalışmada, deneysel periodontitis oluşturulan ratlarda Wnt 10b ekspresyonunun arttığını göstermişlerdir (Lima ve ark., 2017). Çalışmamızda Wnt 10b tüm klinik periodontal parametrelerle güçlü pozitif korelasyon, Wnt 3a ve Wnt 5a ile zayıf pozitif korelasyon göstermiştir. Bu bulgular Wnt 10b'nin periodontitis patogenezinde kemik homeostazının sağlanmasında oldukça önemli bir molekül olduğunu desteklemektedir. İmmunohistokimyasal analizde GAP grubunda sıklıkla bağ dokuda boyanma gözlenirken GKP grubunda basal membran seviyesinde boyanma izlenmiştir. GKP grubundaki bu özellik inflamasyonun daha kronik ve uzun süreli olması ve buna bağlı olarak yüzeyle yakın yoğunlaşması ile açıklanabilir. Ancak sonuç olarak her iki grupta da kontrol grubundan yüksek oranda boyanma elde edilmiştir. PCR sonuçları açısından da gruplar arasında fark olmaması bu molekülün her iki hastalık antitesinde aktif rol oynadığı hipotezini desteklemektedir.

Çalışmamız Runx2 RT PCR sonuçları kontrol grubu için 1 ± 0.23 , GAP grubu için 2.55 ± 1.24 ve GKP grubu için 1.39 ± 0.58 olarak bulunmuştur. Her iki hastalık grubunda K grubundan istatistiksel anlamlı yüksek bulunmakla birlikte hastalık grupları arasında da istatistiksel anlamlı fark saptanmıştır. Runx2 Wnt / β -catenin sinyal yolağının hedef genlerinden biridir ve mezenşimal hücrelerden osteoblast farklılaşmasını ve iskelet gelişimini kontrol eden önemli bir moleküldür (Gaur ve ark., 2005). Her ne kadar osteoblast farklılaşması ile ilişkilendirilse de Runx2'nin aşırı ekspresyonuna osteoklast farklılaşması ve daha yüksek Rankl / Opg oranı eşlik ettiği gösterilmiştir (Geoffroy ve ark., 2002). Bu bulgular, Runx2'nin in vitro Rankl ve Opg ekspresyonunun doğrudan bir düzenleyicisi olarak rol oynadığını desteklemektedir (Gao ve ark., 1998).

Periodontitis patogenezinde Runx2 aktivitesini değerlendiren kısıtlı sayıda çalışma mevcuttur. Çalışmamızdan farklı olarak Li ve ark. 2016 yılında periodontitise bağlı hipoksi koşullarında Runx2 ekspresyonunun düştüğünü göstermişlerdir (Li ve ark., 2016). Ancak kemik metabolizmasının düzenlenmesinde görevli olan Wnt3a ve Wnt 10b'nin artmış ekspresyonları, standart Wnt / β -catenin sinyal yolağının hedef genlerinin artmış ekspresyonuna neden olacağından artmış Runx2 ekspresyonu şaşırtıcı bir sonuç değildir. Mevcut tablo, dokunun kompensasyon mekanizmaları ile ilişkilendirilebilir.

Periodontitis immun patofizyolojisi nedeniyle çeşitli hücre içi yolakların aktive olduğu oldukça karmaşık bir hastalıktır. Agresif ve kronik periodontitis benzer klinik bulgulara sahip olmakla birlikte yaş gibi bir değişkene bağlı olması nedeniyle klinik olarak iç içe geçmiş iki tablodur. 2017 yılı sınıflamasında, anguler yıkım paterni ve plak akümüasyon miktarıyla orantısız destek doku kaybı olmasına rağmen ileri yaşlardaki bireylerin kronik periodontitis olarak sınıflandırılması gibi klinik kısıtlılıklar göz önünde bulundurularak geliştirilmiş olmasına rağmen yapılan immünolojik çalışmalar bu iki hastalığın benzer klinik bulgulara sahip farklı antiteler olduğunu desteklemektedir(Abuhussein ve ark., 2014; Arabacı ve ark., 2010; Bantel ve ark., 2005; Deguchi ve ark., 1990; Hajishengallis, 2014 ve Papapanou ve ark., 2013)) Her ne kadar biz araştırmamıza başladığımızda kabul edilen sınıflama 1999 sınıflaması olsa ve bu bir antitez çalışması olmasa da elde ettiğimiz bulgular Wnt proteinlerinin her iki hastalık grubunda farklı davranışlar gösterdiğini ortaya koymuştur. Papapanou ve ark. 2013 yılında yaptıkları çalışmalarında transkriptom analizi ile agresif periodontitis ile kronik periodontitis arasındaki gen ekspresyon farklılıklarını değerlendirmişler ve bir grup gende farklılık gözlemişlerdir. Buna göre agresif periodontitiste overeksprese olan genler immun cevap, apoptozis ve sinyal transdüksiyonu ile ilişkiliyken, kronik periodontitiste epitelyal bütünlük ve metabolizma ile ilişkili genler overeksprese edilmektedir. Aynı çalışmada sinyal transdüksiyonu ile ilişkili genlerden Jun ve Wnt 'in overeksprese olduğu gösterilmiştir. Biz de çalışmamız sonuncunda GAP grubunda Wnt 3a ve Wnt 5a proteinlerinin GKP grubundan yüksek oranda eksprese edildiğini bulguladık. NF- κ B sinyal yolağıyla olan etkileşimleri nedeniyle Wnt 3a ile Wnt 5a arasında gelişen ters etkileşimi hastalık

fazıyla ilişkilendirmek mümkündür. Aktif yıkım fazındaki hastalardan elde edilen dokularda Wnt 5a ekspresyonunun Wnt 3a ekspresyonundan fazla olması ve standart sinyal yolağı üzerinden etki göstermediğinden ve hücre içi sıkı feedback mekanizmaları nedeniyle azalmış β -catenin ekspresyonu izlenmiş olabilir. İmmunohistokimyasal analiz sonucunda hastalık gruplarında β -catenin'in sıklıkla intranukleer yerleşim göstermesi yolağın aktive olduğu ancak sonrasında negatif regülatörler nedeniyle ekspresyonunun düştüğünü göstermektedir. Wnt 10b, Wnt 3a ile birlikte osteoblastik farklılaşmayı yönetmektedir ve etkilerini Runx2 üzerinden göstermektedirler. Artmış doku destrüksiyonunu sınırlandırmak amacıyla ekspresyonlarının artması ve bunun sonucunda Runx2 düzeyinin artması öngörülebilir bir sonuçtur.

Çalışmamız; bu yolakların zaman bağımlı değişimlerinin incelenmemesi, Wnt 3a' nın immunohistokimyasal olarak değerlendirilememiş olması, hücre bazında NF- κ B sinyal yolağı ile etkileşiminin doğrudan incelenmemesi gibi kısıtlılıkları olmakla birlikte, çalışılan yolakların farklı periodontal hastalık tiplerindeki aktivitelerinin karşılaştırılması ve cevabın farklı doku seviyelerinde incelenmiş olması özelliği ile, periodontal hastalık patogenezeine farklı bir yönden bakış ve değerlendirme yapma yönünde katkı sağlayabilir. Doku cevabının hücre bazında anlaşılması periodontal hastalığın doğasının aydınlatılması ve tedavisi açısından oldukça değerlidir. Bu alanda yapılacak olan ileri çalışmalar hastalık patofizyolojisinin aydınlatılmasına aracılık edebilir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Tüm klinik periodontal parametreler hastalık gruplarında istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur.
2. TNF- α , Wnt 3a, Wnt 5a, Wnt 10b ve Runx2 ekspresyonu hastalık gruplarında kontrol grubundan istatistiksel anlamlı yüksek bulunmuştur.
3. β -catenin ekspresyonu GAP grubunda K grubundan istatistiksel anlamlı daha düşük bulunmuştur.
4. β -catenin hastalık gruplarında sıklıkla bağ dokusundan intranükleer olarak boyanırken, kontrol grubunda epitel dokuda intrastoplazmik ve hücre çeperinde boyanmaktadır.
5. Wnt 5a sıklıkla hastalık gruplarında boyanmakta olup en yoğun boyanma GAP örneklerinde ve özellikle bağ dokuda izlenmiştir. GKP grubunda hafif yoğunlukta boyanma mevcut olup epitelyal dokuda boyanma gözlenmiştir.
6. Wnt 10b hastalık gruplarında bağ dokuda boyanma gösterirken GKP grubunda GAP grubundan yoğun boyanma izlenmiştir.

İmmun inflamatuvar bir hastalık olan peridontitiste yapım yıkım mekanizmalarının eş zamanlı aktivasyonu söz konusudur ve hastalığın gidişatını hangi mekanizmanın daha baskın olduğu belirler. Bu süreçte birçok hücre içi sinyal yolağı aktif olarak rol almaktadır.

Birçok dokunun homesotazında görevli olan Wnt / β -catenin sinyal yolağı periodontitis patogenezindeki aktif yolaklardan birisidir. Wnt 3a ve Wnt 10b, doku kaybının kompensasyonu için aktive olurken, Wnt 5a kemik yıkımı sürecinde aktiftir. Ancak bu yolağın NF- κ B gibi periodontitis patogenezindeki aktif yolaklarla olan

Çapraz etkileşiminin incelendiği, yolağın aktivatörlerinin ve inhibitörlerinin birlikte incelendiği ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Periodontitis patogenezindeki rolleri henüz tam olarak ortaya konulamamış Wnt / β -catenin, ADMA/SDMA, FoxO gibi bazı sinyal yolaklarının fonksiyonları aydınlatıldıķa periodontal hastalığın tedavisine yönelik yeni uygulamalar da oluşturulabilecektir.

ÖZET

Kronik ve Agresif Periodontitis Hastalarında Wnt/ β -Catenin Sinyal Yolağının Değerlendirilmesi

Bakteriler periodontitisin patogenezinde bir başlatıcı unsur olmakla birlikte konak faktörleri, hastalığın ilerlemesinde önemli rol oynarlar. Periodontitiste, inflamatuvar immun cevabın neden olduğu kemik yıkımı, inflamatuvar infiltrasyon ile kemik homeostazından sorumlu hücreler arasındaki iki yönlü etkileşimden kaynaklanmaktadır ve kemik metabolizmasının düzenlenmesi, sitokinler, kemokinler, hormonlar ve biyokimyasal stimülasyon dahil olmak üzere çeşitli lokal ve sistemik faktörlere bağlı olarak farklı sinyal iletim yollarının karmaşık bir işlemidir. Bakteri kaynaklı PAMP'lar ve hücre hasarı sonucunda salınan DAMP'lar, TLR gibi patern tanıma reseptörleri aracılığıyla adherens junctionlardan hücre içerisine β -catenin'in salınmasını ve Wnt aracılığıyla hücre kaderini belirleyen bir çok genin ekspresyonuna neden olurlar. Kemik homeostazisi, mezenşimal hücre diferansiyasyonu ve makrofaj cevabında etkili olan Wnt molekülleri artan hücre biyolojisi bilgisiyle periodontitis için potansiyel önemli moleküller haline gelmiştir. Mevcut literatür bulgularının ışığında, Wnt / β -catenin sinyal yolağının periodontitiste doku yanıtının düzenleyicisi olabileceği ve farklı periodontal hastalık formlarında farklı şekilde eksprese edilebileceği hipotezinden hareketle çalışmamızın esas amacı, kronik ve agresif periodontitisli hastalardan alınan dişeti örneklerinde Wnt / β -catenin sinyal moleküllerinin salınımını ve doku yoğunluklarını değerlendirmektir. Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı Kliniği'ne başvuran generalize kronik periodontitis teşhisi konulan 15 hasta generalize agresif periodontitis teşhisi konulan 11 hasta ve periodontal olarak sağlıklı 15 gönüllü birey çalışmaya dahil edilmiştir. Her dişin altı yüzünden klinik periodontal ölçümler yapılmış, kontrol grubu için estetik nedenlerle kron boyu uzatma ve gingivektomi endikasyonu konulmuş dişlerden işlem sırasında eksize edilen dokular ile hastalık gruplarında periodontitis nedeniyle çekim endikasyonu konulan dişlerin çevresinden eksize edilen biyopsi materyali RT PCR ve immunohistokimyasal analiz için kullanılmıştır. RT PCR ile TNF- α , β -catenin, Wnt 3a, Wnt 5a, Wnt 10b ve Runx2 gen ekspresyonları ve immunohistokimyasal analiz ile doku β -catenin, Wnt 5a ve Wnt 10b yoğunlukları değerlendirilmiştir. Tüm klinik periodontal parametreler hastalık gruplarında istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur. TNF- α , Wnt 3a, Wnt 5a, Wnt 10b ve Runx2 ekspresyonu hastalık gruplarında kontrol grubundan istatistiksel anlamlı yüksek bulunmuştur. β -catenin ekspresyonu GAP grubunda K grubundan istatistiksel anlamlı daha düşük bulunmuştur. β -catenin hastalık gruplarında sıklıkla bağ dokusundan intranükleer olarak boyanırken, kontrol grubunda epitel dokuda intrastoplazmik ve hücre çeperinde boyanmaktadır. Wnt 5a sıklıkla hastalık gruplarında boyanmakta olup en yoğun boyanma GAP örneklerinde bağ dokuda izlenmiştir. GKP grubunda hafif yoğunlukta boyanmakta olup epitelyal dokuda boyanma gözlenmiştir. Wnt 10b hastalık gruplarında bağ dokuda boyanma gösterirken

GKP grubunda GAP grubundan yoğun boyanmaktadır. Sonuç olarak birçok dokunun homesotazında görevli olan Wnt / β -catenin sinyal yolağı periodontitis patogenezindeki aktif yolaklardan birisidir. Wnt 3a ve Wnt 10b, doku kaybının kompensasyonu için aktive olurken, Wnt 5a kemik yıkımı sürecinde aktiftir.

Anahtar kelimeler: agresif periodontitis, kronik periodontitis, Wnt 3a, Wnt 5a, Wnt 10b, β -catenin

SUMMARY

Evaluation of Wnt / β -Catenin Signaling Pathway in Chronic and Aggressive Periodontitis Patients

Although bacteria are an initiating factor in the pathogenesis of periodontitis, host factors play an important role in the progression of the disease. In periodontitis, bone destruction caused by the inflammatory immune response is caused by the bidirectional interaction between inflammatory infiltration and the cells responsible for bone homeostasis. Regulation of bone metabolism is a complex process of different signal transduction pathways dependent on a variety of local and systemic factors, including cytokines, chemokines, hormones, and biochemical stimulation. Bacteria derived PAMPs, and DAMPs which are released as a result of cell damage, release of β -catenin from adherence junctions into the cell via pattern recognition receptors such as TLR and the expression of many genes that determine cell fate through Wnt. Wnt molecules which are effective in bone homeostasis, mesenchymal cell differentiation and macrophage response have become potentially important molecules for periodontitis with increasing knowledge of cell biology. In the light of the current literature findings, based on the hypothesis that the Wnt / β -catenin signaling pathway may be a regulator of the tissue response in periodontitis and can be expressed differently in different forms of periodontal disease, the main purpose of our study is to evaluate the release of Wnt / β -catenin signaling molecules and tissue density in gingival samples taken from patients with chronic and aggressive periodontitis. 15 patients diagnosed with generalized chronic periodontitis, 11 patients diagnosed with generalized aggressive periodontitis and 15 periodontally healthy volunteers who applied to Ankara University Faculty of Dentistry Department of Periodontology Department were included in the study. Clinical periodontal measurements were made on six faces of each tooth. Tissues excised during the procedure from teeth for which crown lengthening and gingivectomy were indicated for aesthetic reasons were used as biopsy material in the control group. The biopsy material excised from the periphery of the teeth for extraction indication for periodontitis in disease groups. TNF- α , β -catenin, Wnt 3a, Wnt 5a, Wnt 10b and Runx2 gene expressions evaluated by RT PCR and β -catenin, Wnt 5a and Wnt 10b concentrations were evaluated by immunohistochemical analysis. All clinical periodontal parameters were found to be statistically significantly higher in disease groups. The expression of TNF- α , Wnt 3a, Wnt 5a, Wnt 10b and Runx2 was significantly higher in the disease groups than in the control group. The expression of β -catenin was statistically significantly lower in the GAP group than in the K group. While β -catenin stains intranuclearly from connective tissue in disease groups, it stains intrastoplasmic in epithelial tissue and cell wall in the control group. Wnt 5a is frequently stained in disease groups, and the most intense staining was observed in connective tissue in GAP samples. In the CCP group, they are stained in light intensity and staining was observed in the epithelial tissue. Wnt 10b shows staining in connective tissue in disease groups, while staining in the GKP group than in the GAP group. As a result, Wnt / β -catenin signaling pathway is one of the active pathways in the pathogenesis of periodontitis. Wnt 3a and

Wnt 10b are activated to compensate for tissue loss, while Wnt 5a is active in the bone resorption process.

Keywords: aggressive periodontitis, chronic periodontitis, Wnt 3a, Wnt 5a, Wnt 10b, β -catenin

KAYNAKLAR

- ABERLE H, BAUER A, STAPPERT J, KISPERS A, KEMLER R (1997). β -catenin is a target for the ubiquitin–proteasome pathway. *The EMBO journal* **16(13)**: 3797-3804.
- ABUHUSSEIN H, BASHUTSKI JD, DABIRI D, HALUBAI S, LAYHER M, KLAUSNER C, MAKHOUL H, KAPILA Y (2014). The role of factors associated with apoptosis in assessing periodontal disease status. *J Periodontol*, **85(8)**: 1086-1095.
- AINAMO J, BAY I (1975). Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J*, **25(4)**: 229-235.
- AKALIN FA, BALTACIOĞLU E, ALVER A, KARABULUT E (2007). Lipid peroxidation levels and total oxidant status in serum, saliva and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*, **34(7)**: 558-565.
- AKGUL C, MOULDING DA, EDWARDS SW (2001). Molecular control of neutrophil apoptosis. *FEBS letters*, **487(3)**: 318-322.
- ALBANDAR JM (2014). Aggressive periodontitis: case definition and diagnostic criteria. *Periodontol 2000*, **65**: 13-26.
- AL-SAMADI A, SALEM A, AINOLA M, HIETANEN J, HÄYRINEN-IMMONEN R, KONTTINEN Y (2015). Increased beta 2 defensin in recurrent aphthous ulcer. *Oral dis*, **21(3)**: 292-298.
- ALTMAN LC, BAKER C, FLECKMAN P, LUCHTEL D, ODA D (1992). Neutrophil-mediated damage to human gingival epithelial cells. *J Periodont Res*, **27**: 70-79.
- ANTONOGLOU GN, KNUUTTILA M, NIEMELÄ O, YLÖSTALO P, RAUNIO T, HILTUNEN L, KARTTUNEN R, TERVONEN T (2015). Serum parathyroid hormone and active vitamin D in chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*, **42(8)**: 726-732.
- ARABACI T, CICEK Y, CANAKCI V, CANAKCI CF, OZGOZ M, ALBAYRAK M, KELES ON (2010). Immunohistochemical and Stereologic Analysis of NF- κ B Activation in Chronic Periodontitis. *Eur J Dent*, **4(4)**: 454-61.
- ARMITAGE GC, DICKINSON WR, JENDERSECK RS, LEVINE SM, CHAMBERS DW (1982). Relationship between the percentage of subgingival spirochetes and the severity of periodontal disease. *J Periodontol*, **53**: 550–556.
- ARMITAGE GC (1999). Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*, **4(1)**: 1-6.

- ARMITAGE GC, CULLINAN MP (2010). Comparison of the clinical features of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontol 2000*, **53**: 12-27.
- ARTESE L, SIMON MJ, PIATTELLI A, FERRARI DS, CARDOSO LAG, FAVERI M, ONUMA T, PICCIRILLI M, PERROTTI V, SHIBLI JA (2011). Immunohistochemical analysis of inflammatory infiltrate in aggressive and chronic periodontitis: a comparative study. *Clin Oral Investig*, **15(2)**: 233-40.
- BAER PN (1971). The case for periodontosis as a clinical entity. *J Periodontol*, **42(8)**: 516-20.
- BAKSH D, BOLAND GM, TUAN RS (2007). Cross-talk between Wnt signaling pathways in human mesenchymal stem cells leads to functional antagonism during osteogenic differentiation. *J Cell Biochem*, **101(5)**: 1109-24.
- BANTEL H, BEIKLER T, FLEMMIG TF, SCHULZE-OSTHOFF K (2005). Caspase activation is involved in chronic periodontitis. *FEBS letters*, **579(25)**: 5559-5564.
- BARKER N (2008). The canonical Wnt/ β -catenin signalling pathway. *Wnt Signaling*, Vincan, E. Springer: 5-15.
- BARTOLD P, VAN DYKE T (2013). Periodontitis: a host-mediated disruption of microbial homeostasis. Unlearning learned concepts. *Periodontol 2000*, **2013**: 203-217
- BENNETT CN, LONGO KA, WRIGHT WS, SUVA LJ, LANE TF, HANKENSON KD, MACDOUGALD OA (2005). Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proc Natl Acad Sci USA*, **102(9)**: 3324-3329.
- BLUMENTHAL A, EHLERS S, LAUBER J, BUER J, LANGE C, GOLDMANN T, HEINE H, BRANDT E, REILING N (2006) The Wingless homolog WNT5A and its receptor Frizzled-5 regulate inflammatory responses of human mononuclear cells induced by microbial stimulation. *Blood*, **108**: 965-973.
- BOESING F, PATIÑO J, DA SILVA V, MOREIRA E (2009). The interface between obesity and periodontitis with emphasis on oxidative stress and inflammatory response. *Obes Rev*, **10(3)**: 290-297.
- BONEWALD LF, JOHNSON ML (2008). Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone*, **42(4)**: 606-615.
- BONSIGNORE, LA, ANDERSON, JR, LEE, Z, GOLDBERG, VM, GREENFIELD, EM (2013). Adherent lipopolysaccharide inhibits the osseointegration of orthopedic implants by impairing osteoblast differentiation. *Bone*, **52**: 93-101.
- BONSIGNORE LA, ANDERSON JR, LEE Z, GOLDBERG VM, GREENFIELD EM (2013). Adherent lipopolysaccharide inhibits the osseointegration of orthopedic implants by impairing osteoblast differentiation. *Bone*, **52(1)**: 93-101.

- BOYCE BF (2013). Advances in the regulation of osteoclasts and osteoclast functions. *J Dent Res*, **92**: 860–7.
- BOYDEN LM, MAO J, BELSKY J, MITZNER L, FARHI A, MITNICK MA, WU D, INSOGNA K, LIFTON RP (2002). High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med*, **346**: 1513-1521.
- BREMBECK FH, ROSÁRIO M, BIRCHMEIER W (2006). Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin. *Curr Opin Genet Dev*, **16**: 51-59.
- BRUSSELLE GG, JOOS GF, BRACKE KR (2011). New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*, **378(9795)**: 1015–1026.
- BUHLIN K, HULTIN M, NORDERYD O, PERSSON L, POCKLEY AG, RABE P, KLINGE B, GUSTAFSSON A (2009). Risk factors for atherosclerosis in cases with severe periodontitis. *J Clin Periodontol*, **36(7)**: 541-549.
- BURGERS TA, WILLIAMS BO (2013). Regulation of Wnt/ β -catenin signaling within and from osteocytes. *Bone*, **54(2)**: 244-249.
- BYRNE S, DASHPER S, DARBY I, ADAMS G, HOFFMANN B, REYNOLDS E (2009). Progression of chronic periodontitis can be predicted by the levels of *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* in subgingival plaque. *Oral Microbiol Immunol*, **24(6)**: 469-477.
- CABON L, MARTÍNEZ-TORRES AC, SUSIN SA (2013). Programmed cell death comes in many flavors. *Med Sci: M/S*, **29(12)**: 1117.
- CAI T, SUN D, DUAN Y, WEN P, DAI C, YANG J, HE W (2016). WNT/ β -catenin signaling promotes VSMCs to osteogenic transdifferentiation and calcification through directly modulating Runx2 gene expression. *Exp Cell Res*, **345(2)**: 206-17.
- CANALIS E (2013). Wnt signalling in osteoporosis: mechanisms and novel therapeutic approaches. *Nat Rev Endocrinol*, **9(10)**: 575-583.
- CARRANZA FA JR (1967). Histometric evaluation of periodontal pathology: a review of recent studies. *J Periodontol*, **38**: 741.
- CARRANZA FA JR, CABRINI RL (1967). Histometric studies of periodontal tissues. *Periodontics* **5**: 308.
- CARRANZA FA JR, SIMES RJ, MAYO J, CABRINI RL (1971). Histometric evaluation of periodontal bone loss in rats. *J Periodont Res*, **6**: 65.
- CHATZOPOULOS GS, MANSKY KC, LUNOS S, COSTALONGA M, WOLFF LF (2019). Sclerostin and WNT-5a gingival protein levels in chronic periodontitis and health. *J Periodont Res*, **54(5)**: 555-565.

- CHEN GY, NUÑEZ G (2010). Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol*, **10**(12): 826–837.
- CHEN J, LAN Y, BAEK JA, GAO Y, JIANG R (2009). Wnt/beta-catenin signaling plays an essential role in activation of odontogenic mesenchyme during early tooth development. *Dev Biol*, **334**(1): 174–185.
- CHEN Y, ALMAN BA (2009). Wnt pathway, an essential role in bone regeneration. *J Cell Biochem*, **106** (3): 353–362.
- CHEON SS, CHEAH AYL, TURLEY S, NADESAN P, POON R, CLEVERS H, ALMAN BA (2002). Beta-catenin stabilization dysregulates mesenchymal cell proliferation, motility, and invasiveness and causes aggressive fibromatosis and hyperplastic cutaneous wounds. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**(10): 6973–6978.
- CHEON SS, NADESAN P, POON R, ALMAN BA (2004). Growth factors regulate beta-catenin-mediated TCFdependent transcriptional activation in fibroblasts during the proliferative phase of wound healing. *Exp Cell Res*, **293**(2): 267–274.
- CLARK RA, KLEBANOFF SJ (1975). Neutrophil-mediated tumor cell cytotoxicity: role of the peroxidase system. *J Exp Med*, **141**(6): 1442–1447.
- CLARK RA, OLSSON I, KLEBANOFF SJ (1976). Cytotoxicity for tumor cells of cationic proteins from human neutrophil granules. *J Cell Biol*, **70**(3): 719–723.
- CLEVERS H (2006). Wnt/ β -catenin signaling in development and disease. *Cell*, **127**(3): 469–480.
- DALLAS SL, PRIDEAUX M, BONEWALD LF (2013). The osteocyte: an endocrine cell... and more. *Ende Rev*, **34**(5): 658–690.
- DARVEAU RP (2010). Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat Rev Microbiol*, **8**: 481–90.
- DAVIDOVICH P, KEARNEY CJ, MARTIN SJ (2014). Inflammatory outcomes of apoptosis, necrosis and necroptosis. *Biol Chem*, **395**(10): 1163–1171.
- DAY TF, GUO X, GARRETT-BEAL L, YANG Y (2005). Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell*, **8**: 739–750.
- DE OLIVEIRA RR, SCHWARTZ-FILHO HO, NOVAES AB, GARLET GP, DE SOUZA FR, TABA M. JR., DE SOUZA SLS, RIBEIRO FJ (2009). Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: cytokine profile in gingival crevicular fluid, preliminary results. *J Periodontol*, **80**(1): 98–105.

- DEGUCHI S, HORI T, CREAMER H, GABLER W (1990). Neutrophil mediated damage to human periodontal ligament-derived fibroblasts: Role of lipopolysaccharide. *J Periodont Res*, **25**: 293-299.
- DEMMER RT, PAPAPANOU PN, JACOBS DR JR, DESVARIEUX M (2008) Bleeding on probing differentially relates to bacterial profiles: the Oral Infections and Vascular Disease Epidemiology Study. *J Clinl Periodontol*, **35**: 479–486.
- DENG J, XIA W, MILLER SA, WEN Y, WANG HY, HUNG MC (2004). Crossregulation of NF-kappaB by the APC/GSK-3beta/beta-catenin pathway. *Mol Carcinog*, **39(3)**: 139-146.
- DERETIĆ V, KIMURA T, TIMMINS G, MOSELEY P, CHAUHAN S AND MANDELL M (2015). Immunologic manifestations of autophagy. *J Clin Invest*, **125(1)**: 75-84.
- DIVARIS K, MONDA KL, NORTH KE, OLSHAN AF, REYNOLDS LM, HSUEH WC, LANGE EM, MOSS K, BARROS SP, WEYANT RJ, LIU Y, NEWMAN AB, BECK JD, OFFENBACHER S (2013). Exploring the genetic basis of chronic periodontitis: a genome-wide association study. *Hum Mol Genet*, **22(11)**: 2312–2324.
- DÍSSÍCK A, REDMAN RS, JONES M, B. RANGAN V, REIMOLD A, GRIFFITHS GR, MIKULS TR, AMDUR RL, RICHARDS JS, KERR GS (2010). Association of periodontitis with rheumatoid arthritis: a pilot study. *J Periodontol*, **81(2)**: 223-230.
- e SILVA MR (1978). A brief survey of the history of inflammation. *Agents Actions*, **8(1-2)**: 45-49.
- EBE N, HARA-YOKOYAMA M, IWASAKI K, ISEKI S, OKUHARA S, PODYMA-INOUE KA, TERASAWA K, WATANABE A, AKIZUKI T, WATANABE H, YANAGISHITA M, IZUMI Y (2011). Pocket epithelium in the pathological setting for HMGB1 release. *J Dent Res*, **90(2)**: 235-40.
- ELMORE S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, **35(4)**: 495-516.
- EVERHART MB, HAN W, SHERRILL TP, ARUTIUNOV M, POLOSUKHIN VV, BURKE JR, SADIKOT RT, CHRISTMAN JW, YULL FE, BLACKWELL TS (2006). Duration and intensity of NF-kappaB activity determine the severity of endotoxin-induced acute lung injury. *J Immunol*, **176**: 4995–5005.
- EXPERTVIEW (2017). What is the extent of the role played by genetic factors in periodontitis? In: Perio Insign. vol. Summer 2017: *European Federation of Periodontology*, 1-5.
- FAN TJ, HAN LH, CONG RS, LIANG J (2005). Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin*, **37(11)**: 719-727.

- FAVERI M, MAYER MPA, FERES M, DE FIGUEIREDO LC, DEWHIRST FE, PASTER BJ (2008). Microbiological diversity of generalized aggressive periodontitis by 16S rRNA clonal analysis. *Oral Microbiol Immunol*, **23(2)**: 112-118.
- FINE DH, MARKOWITZ K, FURGANG D, FAIRLIE K, FERRANDIZ J, NASRI C, MCKIERNAN M, GUNSOLLEY J (2007). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and its relationship to initiation of localized aggressive periodontitis: longitudinal cohort study of initially healthy adolescents. *J Clin Microbiol*, **45(12)**: 3859-3869.
- FINK SL, COOKSON BT (2006). Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cell Microbiol*, **8(11)**: 1812-1825.
- FLEMMIG TF (1999). Periodontitis. *Ann Periodontol*, **4**: 32.
- FOLWACZNY M, GLAS J, TOROK HPO, LIMBERSKY O, FOLWACZNY C (2004). Toll-like receptor (TLR) 2 and 4 mutations in periodontal disease. *Clin Exp Immunol*, **135**: 330-335.
- FÖLLER M, HUBER SM, LANG F (2008). Erythrocyte programmed cell death. *IUBMB life*, **60(10)**: 661-668.
- FULLERTON JN, O'BRIEN AJ, GILROY DW (2014). Lipid mediators in immune dysfunction after severe inflammation. *Trends Immunol*, **35**:12-21.
- GAJARDO M, SILVA N, GÓMEZ L, LEÓN R, PARRA B, CONTRERAS A, GAMONAL J (2005). Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population. *J Periodontol*, **76(2)**: 289-294.
- GAO YH, SHINKI T, YUASA T, KATAOKA-ENOMOTO H, KOMORI T, SUDA T, YAMAGUCHI A (1998). Potential role of *cbfa1*, an essential transcriptional factor for osteoblast differentiation, in osteoclastogenesis: regulation of mRNA expression of osteoclast differentiation factor (ODF). *Biochem Biophys Res Commun*, **252**: 697-702.
- GAUR T, LENGNER CJ, HOVHANNISYAN H, BHAT RA, BODINE PVN, KOMM BS, JAVED A, VAN WIJNEN AJ, STEIN JL, STEIN GS, LIAN JB (2005). Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *J Biol Chem*, **280**: 33132-33140.
- GEMMELL E, YAMAZAKI K, SEYMOUR GJ (2002). Destructive periodontitis lesions are determined by the nature of the lymphocytic response. *Crit Rev Oral Biol Med*, **13**: 17-34.
- GEMMELL E, YAMAZAKI K, SEYMOUR GJ (2007). The role of T cells in periodontal disease: homeostasis and autoimmunity. *Periodontol 2000*, **43**: 14-40.
- GEOFFROY V, KNEISSEL M, FOURNIER B, BOYDE A, MATTHIAS P (2002). High bone resorption in adult aging transgenic mice overexpressing *cbfa1/runx2* in cells of the osteoblastic lineage. *Mol Cell Biol*, **22**: 6222-6233.

- GLASS DA, BIALEK P, AHN JD, STARBUCK M, PATEL MS, CLEVERS H, TAKETO MM, LONG F, MCMAHON AP, LANG RA, KARSENTY G (2005). Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell*, **8**: 751-764.
- GLASS II DA, KARSENTY G (2006). Molecular bases of the regulation of bone remodeling by the canonical Wnt signaling pathway. *Curr Top Dev Biol*, **73**: 43-84.
- GLICKMAN I, SMULOW J (1965). Buttressing bone formation in the periodontium. *J Periodontol*, **36**: 365.
- GONG Y, SLEE RB, FUKAI N, RAWADI G, ROMAN-ROMAN S, REGINATO AM, WANG H, CUNDY T, GLORIEUX FH, LEV D, ZACHARIN M, OEXLE K, MARCELINO J, SUWAIRI W, HEEGER S, SABATAKOS G, APTE S, ADKINS WN, ALLGROVE J, ARSLAN-KIRCHNER M, BATCH JA, BEIGHTON P, BLACK GC, BOLES RG, BOON LM, BORRONE C, BRUNNER HG, CARLE GF, DALLAPICCOLA B, DE PAEPE A, FLOEGE B, HALFHIDE ML, HALL B, HENNEKAM RC, HIROSE T, JANS A, JÜPPNER H, KIM CA, KEPPLER-NOREUIL K, KOHLSCHUETTER A, LACOMBE D, LAMBERT M, LEMYRE E, LETTEBOER T, PELTONEN L, RAMESAR RS, ROMANENGO M, SOMER H, STEICHEN-GERSDORF E, STEINMANN B, SULLIVAN B, SUPERTI-FURGA A, SWOBODA W, VAN DEN BOOGAARD MJ, VAN HUL W, VIKKULA M, VOTRUBA M, ZABEL B, GARCIA T, BARON R, OLSEN BR, WARMAN ML, Osteoporosis-Pseudoglioma Syndrome Collaborative Group et. al. (2001). LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell*, **107**: 513-523.
- GRAVES DT, LI J, COCHRAN DL (2011). Inflammation and uncoupling as mechanisms of periodontal bone loss. *J Dent Res*, **90**: 143-53.
- GRAVES DT, OATES T, GARLET GP (2011). Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol*, **3**.
- GREEN DR, FERGUSON T, ZITVOGEL L, KROEMER G (2009). Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nat Rev Immunol*, **9(5)**: 353-363.
- GROVE TK (1982). Periodontal disease. *The Compendium on Continuing Education*, 564-570.
- GURAV A, JADHAV V (2011). Periodontitis and risk of diabetes mellitus. *J diabetes*, **3(1)**: 21-28.
- HAANEN C, VERMES I (1995). Apoptosis and inflammation. *Mediators Inflamm*, **4**.
- HAJISHENGALLIS G (2014). Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends Immunol*, **35**: 3-11.

- HALLESKOG C, MULDER J, DAHLSTRÖM J, MACKIE K, HORTOBÁGYI T, TANILA H, PULI LK, FÄRBER K, HARKANY T, SCHULTE G (2011). WNT signaling in activated microglia is pro-inflammatory. *Glia*, **59**: 119–131.
- HALLESKOG C. ve SCHULTE G. (2013) Pertussis toxin-sensitive heterotrimeric G(ai/o) proteins mediate WNT/b-catenin and WNT/ERK1/2 signaling in mouse primary microglia stimulated with purified WNT-3A. *Cell. Signal.* **25**: 822–828.
- HALLESKOG C., DIJKSTERHUIS J. P., KILANDER M. B., BECERRIL-ORTEGA J., VILLAESCUSA C. J., LINDGREN E., ARENAS E. AND SCHULTE G. (2012). Heterotrimeric G protein-dependent WNT-5A signaling to ERK1/2 mediates distinct aspects of microglia proinflammatory transformation. *J. Neuroinflammation*, **9**: 111.
- HART TC, KORNMAN KS (1997). Genetic factors in the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol 2000*, **14**: 202-215.
- HILL TP, SPÄTER D, TAKETO MM, BIRCHMEIER W, HARTMANN C (2005). Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. *Dev Cell*, **8**: 727-738.
- HOFBAUER LC, HEUFELDER AE (2001). Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med (Berl)*, **79**: 243–253.
- HORIÉ M, YAMAGUCHI Y, SAITO A, NAGASE T, LIZIO M, ITOH M, KAWAJI H, LASSMANN T, CARNINCI P, FORRES ARR, HAYASHIZAKI Y, SUZUTANI T, KAPPERT K, MICKÉ P, OHSHIMA M (2016). Transcriptome analysis of periodontitis-associated fibroblasts by CAGE sequencing identified DLX5 and RUNX2 long variant as novel regulators involved in periodontitis. *Sci Re*, **20(6)**: 33666.
- HSU YH, KIEL DP (2012). Genome-wide association studies of skeletal phenotypes: what we have learned and where we are headed. *J Clin Endocrinol Metab*, **97(10)**: E1958-E1977.
- HUANG S, LU F, ZHANG Z, YANG X, CHEN Y (2011). The role of psychologic stress-induced hypoxia-inducible factor-1 α in rat experimental periodontitis. *J Periodontol*, **82(6)**: 934-941.
- JANG Y, LEE AY, JEONG SH, PARK KH, PAIK MK, CHO NJ, KIM JE, CHO MH (2015). Chlorpyrifos induces NLRP3 inflammasome and pyroptosis/apoptosis via mitochondrial oxidative stress in human keratinocyte HaCaT cells. *Toxicology*, **338**: 37-46.
- JARNBRING F, SOMOGYI E, DALTON J, GUSTAFSSON A, KLINGE B (2002). Quantitative assessment of apoptotic and proliferative gingival keratinocytes in oral and sulcular epithelium in patients with gingivitis and periodontitis. *J Clinical Periodontol*, **29(12)**: 1065-1071.

- KACZMAREK A, VANDENABEELE P, KRYSKO DV (2013). Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity*, **38**(2): 209-223.
- KAJSTURA J, CHENG W, REISS K, CLARK WA, SONNENBLICK EH, KRAJEWSKI S, REED JC, OLIVETTI G, ANVERSA P (1996). Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab. Invest*, **74**: 86–107.
- KALFAYAN B, KIDD JG (1953). Structural changes produced in Brown-Pearce carcinoma cells by means of a specific antibody and complement. *J Exp Med*, **97**(1): 145-162.
- KAMMA JJ, GIANNOPOULOU C, VASDEKIS VG, MOMBELLI A (2004). Cytokine profile in gingival crevicular fluid of aggressive periodontitis: influence of smoking and stress. *J Clin Periodontol*, **31**(10): 894-902.
- KANG TB, YANG SH, TOTH B, KOVALENKO A, WALLACH D (2013). Caspase-8 blocks kinase RIPK3-mediated activation of the NLRP3 inflammasome. *Immunity*, **38**: 27–40.
- KANTARCI A, OYAIKU K, VAN DYKE TE (2003). Neutrophil-mediated tissue injury in periodontal disease pathogenesis: findings from localized aggressive periodontitis. *J Periodontol*, **74**(1): 66-75.
- KAVITHA K, KOWSHIK J, KISHORE TKK, BABA AB, NAGINI S (2013). Astaxanthin inhibits NF- κ B and Wnt/ β -catenin signaling pathways via inactivation of Erk/MAPK and PI3K/Akt to induce intrinsic apoptosis in a hamster model of oral cancer. *Biochim Biophys Acta*, **1830**: 4433–4444.
- KAZAMA H, RICCI JE, HERNDON JM, HOPPE G, GREEN DR, FERGUSON TA (2008). Induction of immunological tolerance by apoptotic cells requires caspase-dependent oxidation of high-mobility group box-1 protein. *Immunity*, **29**(1): 21-32.
- KELK P, ABD H, CLAEISSON R, SANDSTRÖM G, SJÖSTEDT A, JOHANSSON A (2011). Cellular and molecular response of human macrophages exposed to *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin. *Cell Death Dis*, **2**(3): e126-e126.
- KEMLER R (1993). From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genet*, **9**: 317-321.
- KERR JF, WYLLIE AH, CURRIE AR (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, **26**(4): 239-257.
- KLAPHOLZ-BROWN Z, WALMSLEY GG, NUSSE YM, NUSSE R, O BROWN P (2007). Transcriptional program induced by Wnt protein in human fibroblasts suggests mechanisms for cell cooperativity in defining tissuemicroenvironments. *PLoS ONE*, **2**(9): e945.

- KOMORI T (2005). Functions of BMPs, Runx2, and osterix in the development of bone and cartilage. *Nihon Rinsho*, **63(9)**: 1671-1677.
- KOMORI T., YAGI H., NOMURA S., YAMAGUCHI A., SASAKI K., DEGUCHI K., SHIMIZU Y., BRONSON R.T., GAO Y.H., INADA M., SATO M., OKAMOTO R., KITAMURA Y., YOSHIKI S., KISHIMOTO T (1997). Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*, **89**: 755-764.
- KORNMAN KS, PAGE RC, TONETTI MS (1997). The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol 2000*, **14(1)**: 33-53.
- KRYSKO DV, GARG AD, KACZMAREK A, KRYSKO O, AGOSTINIS P, VANDENABEELE P (2012). Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, **12(12)**: 860-875.
- KURITA-OCHIAI T, SETO S, SUZUKI N, YAMAMOTO M, OTSUKA K, ABE K, OCHIAI K (2008). Butyric acid induces apoptosis in inflamed fibroblasts. *J Dent Res*, **87(1)**: 51-55.
- LAFaurIE GI , CONTRERAS A, BARÓN A, BOTERO J, MAYORGA-FAYAD I, JARAMILLO A, GIRALDO A, GONZÁLEZ F, MANTILLA S, BOTERO A, ARCHILA LH, DÍAZ A, CHACÓN T, CASTILLO DM, BETANCOURT M, AYA MDR, ARCE R (2007). Demographic, clinical, and microbial aspects of chronic and aggressive periodontitis in Colombia: a multicenter study. *J Periodontol*, **78(4)**: 629-639.
- LAINE ML, CRIELAARD W, LOOS BG (2012). Genetic susceptibility to periodontitis. *Periodontol 2000*, **58(1)**: 37-68.
- LAINE ML, JEPSEN S, LOOS BG (2014). Progress in the identification of genetic factors in periodontitis. *Curr Oral Health Rep*, **1**: 272-278.
- LAINE ML, MORRE SA, MURILLO LS, VAN WINKELHOFF AJ, PENA AS (2005). CD14 and TLR4 gene polymorphisms in adult periodontitis. *J Dent Res*, **84**: 1042-1046.
- LANG NP, BARTOLD PM, CULLINAN M, JEFFCOAT M, MOMBELLI A, MURAKAMI S, PAGE R, PAPAPANOU P, TONETTI M, VAN DYKE T (1999). Consensus Report: aggressive periodontitis. *Ann Periodontol*, **4**: 53.
- LECLERC N, NOH T, COGAN J, SAMARAWICKRAMA DB, SMITH E, FRENKEL B (2008). Opposing effects of glucocorticoids and Wnt signaling on Krox20 and mineral deposition in osteoblast cultures. *J Cell Biochem*, **103(6)**: 1938-1951.
- LEE A, WHYTE MK, HASLETT C (1993). Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators. *J Leukoc Biol*, **54(4)**: 283-288.

- LEE MH, KİM YJ, YOON WY, KİM JI, KİM BG, HWANG YS, WOZNEY JM, CHİ XZ, BAE SC, CHOİ KY, CHO JY, CHOİ JY, RYOO HM (2005). Dlx5 specifically regulates Runx2 type II expression by binding to homeodomain-response elements in the Runx2 distal promoter. *J Biol Chem*, **280(42)**: 35579-35587.
- LERIS A, ROBERTS T, JIANG W, NEWBOLD R, MOKBEL K (2005). WNT5A expression in human breast cancer. *Anticancer Res*, **25**: 731–734.
- LEUCHT P, HELMS JA (2015). Wnt signaling: an emerging target for bone regeneration. *J Am Acad Orthop Surg*, **23(1)**: 67–68.
- LEUNG WK, WU Q, HANNAM PM, MCBRİDE BC, UİTTO VJ (2002). Treponema denticola may stimulate both epithelial proliferation and apoptosis through MAP kinase signal pathways. *J Periodontal Res*, **37(6)**: 445-455.
- LIMA MDR, LOPES AP, MARTINS C, BRITO GAC, CARNEIRO VC, GOES P (2017). The Effect of Calendula officinalis on Oxidative Stress and Bone Loss in Experimental Periodontitis. *Front Physiol*, **28(8)**: 440.
- LIN H, ANGELI M, CHUNG KJ, EJIMADU C, ROSA AR, LEE T (2016). sFRP2 activates Wnt/ β -catenin signaling in cardiac fibroblasts: differential roles in cell growth, energy metabolism, and extracellular matrix remodeling. *Am J Physiol Cell Physiol*, **311(5)**: C710-C719.
- Lİ K, DONG SG, ZHANG HX, ZHOU S, MA L, YU QQ, JİANG ZY, HU QF, ZHOU D (2016). Expression of RUNX2 and MDM21 in rats with periodontitis under chronic intermittent hypoxia. *Asian Pac J Trop Med*, **9(8)**: 781-785.
- LİN C, JİANG X, DAİ Z, GUO X, WENG T, WANG J, Lİ Y, FENG G, GAO X, HE L (2009). Sclerostin mediates bone response to mechanical unloading through antagonizing Wnt/beta-catenin signaling. *J Bone Miner Res*, **24(10)**: 1651-1661.
- LİNDHE J, HAFFAİEE A, SOCRANSKY S (1983). Progression of periodontal disease in adult subjects in the absence of periodontal therapy. *J Clin Periodontol*, **10(4)**: 433-442.
- LİNDHE J, RANNEY R, LAMSTER I, CHARLES A, CHUNG C-P, FLEMMİG T, KİNANE D, LİSTGARTEN M, LOE H, SCHOOR R, SEYMOUR G, SOMERMAN M (1999). Consensus Report: chronic periodontitis. *Ann Periodontol*, **4**: 38.
- LİNKERMANN A, GREEN DR (2014). Necroptosis. *N Engl J Med*, **370(5)**: 455-465.
- LİSTGARTEN M (1976). Structure of the microbial flora associated with periodontal health and disease in man: a light and electron microscopic study. *J Periodontol*, **47(1)**: 1-18.
- LİU F, KOHLMEİER S, WANG CY (2008). Wnt signaling and skeletal development. *Cell Signal*, **20(6)**: 999-1009.

- LIU RK, CAO CF, MENG HX, GAO Y (2001). Polymorphonuclear neutrophils and their mediators in gingival tissues from generalized aggressive periodontitis. *J Periodontol*, **72**: 1545–1553.
- LIU W., TOYOSAWA S., FURUICHI T., KANATANI N., YOSHIDA C., LIU Y., HIMENO M., NARAI S., YAMAGUCHI A., KOMORI T (2001). Overexpression of Cbfa1 in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures. *J Cell Biol*, **155**: 157-166.
- LIU X, ZHANG Z, PAN S, SHANG S, LI C (2018). Interaction between the Wnt/ β -catenin signaling pathway and the EMMPRIN/MMP-2, 9 route in periodontitis. *J Periodontal Res*, **53(5)**: 842-852.
- LIU YQ, HONG ZL, ZHAN LB, CHU HY, ZHANG XZ, LI GH (2016). Wedelolactone enhances osteoblastogenesis by regulating Wnt/ β -catenin signaling pathway but suppresses osteoclastogenesis by NF- κ B/c-fos/NFATc1 pathway. *Sci Rep*, **6**: 32260.
- LIU YZ, MANEY P, PURI J, ZHOU Y, BADDOO M, STRONG M, WANG YP, FLEMINGTON E, DENG HW (2016). RNA-sequencing study of peripheral blood monocytes in chronic periodontitis. *Gene*, **581(2)**: 152-160.
- LOGAN CY, NUSSE R (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**: 781-810.
- LOOS BG, PAPANTONOPOULOS G, JEPSEN S, LAINE ML (2015). What is the contribution of genetics to periodontal risk? *Dent Clin North Am*, **59**: 761-780.
- LÖE H, ANERUD A, BOYSEN H, MORRISON E (1986). Natural history of periodontal disease in man: rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. *J Clin Periodontol*, **13(5)**: 431-440.
- LÖE H, SILNESS P (1963). Periodontal disease in pregnancy I. *Acta Odontol Scand*, **21**: 533-551.
- LÖE H, THEILAD E, JENSEN SB (1965). Experimental gingivitis in man. *J Periodontol*, **36**: 177–187.
- LUNDMARK A, DAVANIAN H, BÅGE T, JOHANNSEN G, KORO C, LUNDEBERG J, YUCEL-LINDBERG T (2015). Transcriptome analysis reveals mucin 4 to be highly associated with periodontitis and identifies pleckstrin as a link to systemic diseases. *Sci Rep*, **5**: 18475.
- MA B, FEY M, HOTTIGER MO (2015). WNT/ β -catenin signaling inhibits CBP-mediated RelA acetylation and expression of proinflammatory NF- κ B target genes. *J Cell Sci*, **128**: 2430–2436.
- MA B, HOTTIGER MO (2016). Crosstalk between Wnt/ β -Catenin and NF- κ B Signaling Pathway during Inflammation. *Front Immunol*, **7(3)**.

- MADUREIRA DF, DE ABREU LIMA IL, COSTA GC, LAGES EMB, MARTINS CC, DA SILVA TA (2018). Tumor Necrosis Factor- α in Gingival Crevicular Fluid as a Diagnostic Marker for Periodontal Diseases: A Systematic Review. *J Evid Based Dent Pract*, **18(4)**: 315-331.
- MAEDA K, KOBAYASHI Y, UDAGAWA N, UEHARA S, ISHIHARA A, MIZOGUCHI T, KIKUCHI Y, TAKADA I, KATO S, KANI S, NISHITA M, MARUMO K, MARTIN TJ, MINAMI Y, TAKAHASHI N (2012). Wnt5a-Ror2 signaling between osteoblast-lineage cells and osteoclast precursors enhances osteoclastogenesis. *Nat Med*, **18**: 405–412.
- MAEKAWA T, KULWATTANAPORN P, HOSUR K, DOMON H, ODA M, TERAOKA Y, MAEDA T, HAJISHENGALLIS G (2017). Differential Expression and Roles of Secreted Frizzled-Related Protein 5 and the Wingless Homolog Wnt5a in Periodontitis. *J Dent Res*, **96(5)**: 571-577.
- MAIURI MC, ZALCKVAR E, KIMCHI A, KROEMER G (2007). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8(9)**: 741-752.
- MANGAN D, MERGENHAGEN S, WAHL S (1993). Apoptosis in human monocytes: possible role in chronic inflammatory diseases. *J Periodontol*, **64(5)**: 461.
- MATZINGER P (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* **12(9)**: 911-945.
- MCCREA PD, TURCK CW, GUMBINER B (1991). A homolog of the armadillo protein in *Drosophila* (plakoglobin) associated with E-cadherin. *Science*, **254(5036)**: 1359-1361.
- MCCULLY JD, WAKIYAMA H, HSIEH YJ, JONES M, LEVITSKY S (2004). Differential contribution of necrosis and apoptosis in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*, **286**: H1923–H1935.
- MENG W, TAKEICHI M (2009) Adherens junction: molecular architecture and regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**: a002899.
- MOMBELLI A, CASAGNI F, MADIANOS PN (2002). Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive periodontitis? A systematic review. *J Clin Periodontol*, **29(s3)**: 10-21.
- MOON RT, BOWERMAN B, BOUTROS M, PERRIMON N (2002). The promise and perils of Wnt signaling through β -catenin. *Science*, **296(5573)**: 1644-1646.
- MORI K, YANAGITA M, HASEGAWA S, KUBOTA M, YAMASHITA M, YAMADA S, KITAMURA M, MURAKAMI S (2015). Necrosis-induced TLR3 activation promotes TLR2 expression in gingival cells. *J Dent Res*, **94(8)**: 1149-1157.

- MURRAY D, WILTON J (2003). Lipopolysaccharide from the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* prevents apoptosis of HL60-derived neutrophils in vitro. *Infect Immun*, **71(12)**: 7232-7235.
- MÜLLER HP(2009) Multilevel modeling of gingival bleeding on probing in young adult carriers of non-JP2-like strains of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Clin Oral Invest*, **13**: 171–178.
- NAKATSU S, YOSHINAGA Y, KURAMOTO A, NAGANO F, ICHIMURA I, OSHINO K, YOSHIMURA A, YANO Y, HARA Y (2014). Occlusal trauma accelerates attachment loss at the onset of experimental periodontitis in rats. *J Periodont Res*, **49(3)**: 314-322.
- NANBARA H, WARA-ASWAPATI N, NAGASAWA T, YOSHIDA Y, YASHIRO R, BANDO Y, KOBAYASHI H, KHONGCHAROENSUK J, HORMDEE D, PITIPHAT W, BOCH JA, IZUMI Y (2012). Modulation of Wnt5a expression by periodontopathic bacteria. *PLoS One*, **7(4)**: e34434.
- NEMOTO E, KOSHIKAWA Y, KANAYA S, TSUCHIYA M, TAMURA M, SOMERMAN MJ, SHIMAUCHI H (2009). Wnt signaling inhibits cementoblast differentiation and promotes proliferation. *Bone*, **44(5)**: 805-812.
- NEWMAN MG, TAKEI H, KLOKKEVOLD PR, CARRANZA FA (2011). Carranza's clinical periodontology, *Elsevier health sciences*.
- NOVAK MJ, NOVAK KF: Early-onset periodontitis. Newman MG, Takei H, Klokkevold PR, Carranza FA (2011). Carranza's clinical periodontology, *Elsevier health sciences*.. *Curr Opin Periodontol* **3:45**, 1996.
- NUSSE R (2005). Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res*, **15(1)**: 28-32.
- NUSSE R, CLEVERS H (2017). Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell*, **169(6)**: 985.
- NUSSE R, VARMUS HE (1992). Wnt genes. *Cell*, **69(7)**: 1073-1087.
- OKAHASHI N, INABA H, NAKAGAWA I, YAMAMURA T, KUBONIIWA M, NAKAYAMA K, HAMADA S, AMANO A (2004). *Porphyromonas gingivalis* induces receptor activator of NF-kappaB ligand expression in osteoblasts through the activator protein 1 pathway. *Infect Immun*, **72(3)**: 1706-1714.
- OTTO F, THORNELL AP, CROMPTON T, DENZEL A, GILMOUR KC, ROSEWELL IR, STAMP GW, BEDDINGTON RS, MUNDLOS S, OLSEN BR, SELBY PB, OWEN MJ (1997). *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell*, **89**: 765-771.
- OZAWA M, BARIBAULT H, KEMLER R (1989). The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J*, **8(6)**: 1711-1717.

- PACHECO FJ, ALMAGUEL FG, EVANS W, RÍOS-COLON L, FÍLIPPOV V, LEOH LS, ROOK-ARENA E, MEDÍAVÍLLA-VARELA M, DE LEON M, CASÍANO CA (2014). Docosahexanoic acid antagonizes TNF- α -induced necroptosis by attenuating oxidative stress, ceramide production, lysosomal dysfunction, and autophagic features. *Inflamm Res*, **63**(10): 859-871.
- PAPAPANOU PN, SANZ M, BUDUNELI N, DIETRICH T, FERES M, FINE DH, FLEMMIG TF, GARCÍA R, GIANNOBILE WV, GRAZIANI F, GREENWELL H, HERRERA D, KAO RT, KEBSCHULL M, KINANE DF, KIRKWOOD KL, KOCHER T, KORNMAN KS, KUMAR PS, LOOS BG, MACHTEI E, MENG H, MOMBELLI A, NEEDLEMAN I, OFFENBACHER S, SEYMOUR GJ, TELES R, TONETTI MS (2018). Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol*, **89**(1): S173-S182.
- PASPARAKIS M, VANDENABEELE P (2015). Necroptosis and its role in inflammation. *Nature*, **517**(7534): 311-320.
- PEI J, FAN L, NAN K, LI J, SHI Z, DANG X, WANG K (2017). Excessive Activation of TLR4/NF- κ B Interactively Suppresses the Canonical Wnt/ β -catenin Pathway and Induces SANFH in SD Rats. *Sci Rep*, **7**(1): 11928.
- PEIFER M, MCCREA PD, GREEN KJ, WIESCHAUS E, GUMBINER BM (1992). The vertebrate adhesive junction proteins beta-catenin and plakoglobin and the Drosophila segment polarity gene armadillo form a multigene family with similar properties. *J Cell Biol*, **118**: 681-691.
- PEREIRA C, SCHAEER DJ, BACHLI EB, KURRER MO, SCHOEDON G (2008). Wnt5A/CaMKII signaling contributes to the inflammatory response of macrophages and is a target for the antiinflammatory action of activated protein C and interleukin-10. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **28**: 504–510.
- POLAKIS P (2000). Wnt signaling and cancer. *Genes Dev*, **14**: 1837 – 1851.
- PÖLLÄNEN M, LAINE M, IHALIN R, UUTTO VJ (2012). Host-bacteria crosstalk at the dentogingival junction. *Int J Dent*, **2012**: 821383.
- PRESHAW P, ALBA A, HERRERA D, JEPSEN S, KONSTANTINIDIS A, MAKRIKAKIS K, TAYLOR R (2012). Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. *Diabetologia*, **55**(1): 21-31.
- QIN S, WANG H, YUAN R, LI H, OCHANI M, OCHANI K, ROSAS-BALLINA M, CZURA CJ, HUSTON JM, MILLER E (2006). Role of HMGB1 in apoptosis-mediated sepsis lethality. *J Exp Med*, **203**(7): 1637-1642.
- RAFF MC (1992). Social controls on cell survival and cell death. *Nature*, **356**(6368): 397-400.

- REZAEI F, MEEDNU N, EMO JA, SAATIAN B, CHAPMAN TJ, NAYDENOV NG, DE BENEDETTO A, BECK LA, IVANOV AI, GEORAS SN (2011). Polyinosinic: polycytidylic acid induces protein kinase D-dependent disassembly of apical junctions and barrier dysfunction in airway epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol*, **128**(6): 1216-1224.
- ROBBINS GR, WEN H, TING JP (2014). Inflammasomes and metabolic disorders: old genes in modern diseases. *Mol Cell*, **54**(2): 297–308.
- ROSSINI M, GATTI D, ADAMI S (2013). Involvement of WNT/ β -catenin signaling in the treatment of osteoporosis. *Calcif Tissue Int*, **93**: 121–132.
- ROYER PJ, HENRIO K, PAÏN M, LOY J, ROUX A, TISSOT A, LACOSTE P, PÏSON C, BROUARD S, MAGNAN A, COLT CONSORTIUM (2017). TLR3 promotes MMP-9 production in primary human airway epithelial cells through Wnt/ β -catenin signaling. *Respir Res*, **18**(1): 208.
- SANTOS VR, RIBEIRO FV, LIMA JA, NAPIMOGA MH, BASTOS MF, DUARTE PM (2010). Cytokine levels in sites of chronic periodontitis of poorly controlled and well-controlled type 2 diabetic subjects. *J Clin Periodontol*, **37**(12): 1049-1058
- SANZ M, D'AIUTO F, DEANFIELD J, FERNANDEZ-AVILÉS F (2010). European workshop in periodontal health and cardiovascular disease-scientific evidence on the association between periodontal and cardiovascular diseases: A review of the literature. *Eur Heart J Suppl*, **12**(B): B3–12.
- SCHETT G, REDLICH K, XU Q, BIZAN P, GRÖGER M, TOHIDAST-AKRAD M, KIENER H, SMOLEN J, STEINER G (1998). Enhanced expression of heat shock protein 70 (hsp70) and heat shock factor 1 (HSF1) activation in rheumatoid arthritis synovial tissue: differential regulation of hsp70 expression and hsf1 activation in synovial fibroblasts by proinflammatory cytokines, shear stress, and antiinflammatory drugs. *J Clin Invest*, **102**(2): 302–311.
- SCHRODER NW, MEISTER D, WOLFF V, CHRISTAN C, KANER D, HABAN V, PURUCKER P, HERMANN C, MOTER A, GOBEL UB, SCHUMANN RR (2005). Chronic periodontal disease is associated with single-nucleotide polymorphism of the human TLR-4 gene. *Genes Immun*, **6**: 448–451.
- SEO WH, CHO E, THOMAS R, AN SY, RYU JJ, KIM H, SHIN C (2013). The association between periodontitis and obstructive sleep apnea: a preliminary study. *J Periodont Res*, **48**(4): 500-506.
- SHALINI S, DORSTYN L, DAWAR S, KUMAR S (2015). Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ*, **22**(4): 526-539.
- SHAPIRA L, BORINSKY R, SELA MN, SOSKOLNE A (1991). Superoxide formation and chemiluminescence of peripheral polymorphonuclear leukocytes in rapidly progressive periodontitis. *J Clin Periodontol*, **18**: 44-48.

- SHIMADA E, KATAOKA H, MIYAZAWA Y, YAMAMOTO M, IGARASHI T (2012). Lipoproteins of *Actinomyces viscosus* induce inflammatory responses through TLR2 in human gingival epithelial cells and macrophages. *Microbes Infect*, **14(11)**: 916-921.
- SHIN J, KHO SA, CHOI YS, KIM YC, RHYU IC, CHOI Y (2013). Antibody and T cell responses to *Fusobacterium nucleatum* and *Treponema denticola* in health and chronic periodontitis. *PLoS One*, **8(1)**: e53703.
- SILNESS J, LOE H. (1964) Periodontal disease in pregnancy II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol Scand*, **22**: 121-135.
- SMITH M, SEYMOUR GJ, CULLINAN MP (2010). Histopathological features of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontol 2000*, **53**: 45-54.
- SOCRANSKY SS, HAFFAJEE AD (2005). Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000*, **38**: 135–187.
- SOCRANSKY SS, HAFFAJEE AD, SMITH C, DIBART S (1991) Relation of counts of microbial species to clinical status at the sampled site. *J Clin Periodontol*, **18**: 766–775.
- STADLER AF, ANGST PDM, ARCE RM, GOMES SC, OPPERMAN RV, SUSIN C (2016). Gingival crevicular fluid levels of cytokines/chemokines in chronic periodontitis: a meta-analysis. *J Clin Periodontol*, **43**: 727-745
- SUGIYAMA A, UEHARA A, IKI K, MATSUSHITA K, NAKAMURA R, OGAWA T, SUGAWARA S, TAKADA H (2002). Activation of human gingival epithelial cells by cell surface components of black-pigmented bacteria: augmentation of production of interleukin-8, granulocyte colony-stimulating factor and expression of intercellular adhesion molecule 1. *J. Med. Microbiol*, **51**: 27-33.
- TAICHMAN N (1989). Pathogenesis of plaque-associated periodontal disease. *Textbook of clinical periodontology*, 153-192.
- TAKADA S, STARK KL, SHEA MJ, VASSILEVA G, MCMAHON JA, MCMAHON AP (1994). Wnt-3a regulates somite and tailbud formation in the mouse embryo. *Genes Dev*, **8**: 174–189.
- TAKEDA K, KAISHO T, AKIRA S (2003). Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*, **21**: 335–376.
- TANG D, KANG R, COYNE CB, ZEH HJ, LOTZE MT (2012). PAMPs and DAMPs: signals that spur autophagy and immunity. *Immunol Rev*, **249(1)**: 158-175.
- TANG Y, ZHOU X, GAO B, XU X, SUN J, CHENG L, ZHOU X, ZHENG L (2014). Modulation of Wnt/ β -catenin signaling attenuates periapical bone lesions. *J Dent Res*, **93(2)**: 175-82.

- TARAPORE RS, LIM J, TIAN C, PACIOS S, XIAO W, REID D, GUAN H, MATTOS M, YU B, WANG CY, GRAVES DT (2016). NF- κ B Has a Direct Role in Inhibiting Bmp- and Wnt-Induced Matrix Protein Expression. *J Bone Miner Res*, **31**: 52–64.
- TERVAHARTIALA T, KOSKI TH, XU JW, HÄYRINEN-IMMONEN R, HIETANEN J, SORSA T, KONTTINEN YT (2001). Tumor necrosis factor-alpha and its receptors, p55 and p75 in gingiva of adult periodontitis. *J Dent Res*, **80(6)**: 1535-1539.
- TOMITA S, KOMIYA-ITO A, IMAMURA K, KITA D, OTA K, TAKAYAMA S, MAKINO-OI A, KINUMATSU T, OTA M, SAITO A (2013). Prevalence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia* in Japanese patients with generalized chronic and aggressive periodontitis. *Microb Pathog*, **61**: 11-15.
- TONETTI MS, CORTELLINI D, LANG NP (1998). In situ detection of apoptosis at sites of chronic bacterially induced inflammation in human gingiva. *Infect Immun*, **66(11)**: 5190-5195.
- TONETTI MS, MOMBELLI A (1999). Early-onset periodontitis. *Ann Periodontol*, **4**: 39.
- TOPOL L, CHEN W, SONG H, DAY TF, YANG Y (2009). Sox9 Inhibits Wnt Signaling by Promoting β -Catenin Phosphorylation in the Nucleus. *J Biol Chem*, **284(5)**: 3323–3333.
- TROMBELLI L, TATAKIS DN, SCAPOLI C, BOTTEGA S, ORLANDINI E, TOSI M (2004) Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis. II. Identification of “high-responder” and “low-responder” subjects. *J Clin Periodontol*, **31**: 239–252.
- TSAI C, CHEN H, CHEN S, HO Y, HO K, WU Y, HUNG C (2005). Lipid peroxidation: a possible role in the induction and progression of chronic periodontitis. *J Periodont Res*, **40(5)**: 378-384.
- TUNALI M, ATAÖĞLU T, ÇELİK I (2014). Apoptosis: an underlying factor for accelerated periodontal disease associated with diabetes in rats. *Clin Oral Invest*, **18(7)**: 1825-1833.
- UÏTTO VJ, PAN YM, LEUNG WK, LARJAVA H, ELLEN RP, FINLAY BB, MCBRIDE BC (1995). Cytopathic effects of *Treponema denticola* chymotrypsin-like proteinase on migrating and stratified epithelial cells. *Infect Immun*, **63(9)**: 3401-3410.
- VALENTA T, HAUSMANN G, BASLER K (2012). The many faces and functions of β -catenin. *J EMBO*, **31(12)**: 2714-2736.
- VALERIO MS, HERBERT BA, GRIFFIN AC, WAN Z, HILL EG, KIRKWOOD KL (2014). MKP-1 signaling events are required for early osteoclastogenesis in lineage defined progenitor populations by disrupting RANKL-induced NFATc1 nuclear translocation. *Bone*, **60**: 16–25.
- VAN DYKE T, SERHAN C (2003). Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. *J Dent Res*, **82(2)**: 82-90.

- VILLAR J, CABRERA-BENÍTEZ NE, RAMOS-NUEZ A, FLORES C, GARCÍA-HERNÁNDEZ S, VALLADARES F, LÓPEZ-AGUILAR J, BLANCH L, SLUTSKY AS (2014). Early activation of pro-fibrotic WNT5A in sepsis-induced acute lung injury. *Crit Care*, **18(5)**: 568.
- VIRCHOW R (1863). Cellular Pathology as Based Upon Physiological and Pathological Histology, JB Lippincott.
- VISWESWARAN M, POHL S, ARFUSO F, NEWSHOLME P, DILLEY R, PERVAİZ S, DHARARAJAN A (2015). Multi-lineage differentiation of mesenchymal stem cells–To Wnt, or not Wnt. *Int J Biochem Cell Biol*, **68**: 139-147.
- VON MOLTKE J, AYRES JS, KOFOED EM, CHAVARRÍA-SMITH J, VANCE RE (2013). Recognition of bacteria by inflammasomes. *Annu. Rev. Immunol*, **31**: 73–106.
- WAERHAUG J (1976). Subgingival plaque and loss of attachment in periodontosis as observed in autopsy material. *J Periodontol*, **47**: 636-42.
- WAERHAUG J (1977). Subgingival plaque and loss of attachment in periodontosis as evaluated on extracted teeth. *J Periodontol*, **48**: 125-130.
- WALLACH D, KANG TB, KOVALENKO A (2014). Concepts of tissue injury and cell death in inflammation: a historical perspective. *Nat Rev Immunol*, **14(1)**: 51-59.
- WANG G, QU FZ, LI L, LV JC, SUN B (2016). Necroptosis: a potential, promising target and switch in acute pancreatitis. *Apoptosis*, **21(2)**: 121-129.
- WANG PL, SATO K, OIDO M, FUJII T, KOWASHI Y, SHINOHARA M, OHURA K, TANI H, KUBOKI Y (1998). Involvement of CD14 on human gingival fibroblasts in Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide-mediated interleukin-6 secretion. *Arch. Oral Biol*, **43**: 687-694.
- WATANABE K, PETRO BJ, SHLIMON AE, UNTERMAN TG (2008). Effect of periodontitis on insulin resistance and the onset of type 2 diabetes mellitus in Zucker diabetic fatty rats. *J Periodontol*, **79(7)**: 1208-1216.
- WESTENDORF JJ, KAHLER RA, SCHROEDER TM (2004). Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. *Gene*, **27(341)**: 19-39.
- WICKMAN G, JULIAN L, MARDILOVICH K, SCHUMACHER S, MUNRO J, RATH N, ZANDER SA, MLECZAK A, SUMPTON D, MORRICE N (2013). Blebs produced by actin–myosin contraction during apoptosis release damage-associated molecular pattern proteins before secondary necrosis occurs. *Cell Death Differ*, **20(10)**: 1293-1305.
- WILLERT K, JONES KA (2006). Wnt signaling: is the party in the nucleus? *Genes Dev*, **20**: 1394-1404.

- WILLIAMS RC (2008). Understanding and managing periodontal diseases: a notable past, a promising future. *J Periodontol*, **79**: 1552-1559.
- WU B, CRAMPTON SP, HUGHES CCW (2007). Wnt signaling induces matrix metalloproteinase expression and regulates T cell transmigration. *Immun*, **26(2)**: 227-239.
- WU G, HUANG H, GARCÍA ABREU J, HE X (2009). Inhibition of GSK3 phosphorylation of beta-catenin via phosphorylated PPPSPXS motifs of Wnt coreceptor LRP6. *PLoS One*, **4**: 4926.
- WU W, LIU P, LI J (2012). Necroptosis: an emerging form of programmed cell death. *Crit Rev Oncol Hematol*, **82(3)**: 249-258.
- XING Y, CLEMENTS WK, KIMELMAN D, XU W (2003). Crystal structure of a beta-catenin/axin complex suggests a mechanism for the beta-catenin destruction complex. *Genes Dev*, **17**: 2753-2764.
- XING Y, TAKEMARU K, LIU J, BERNDT JD, ZHENG JJ, MOON RT, XU W (2008). Crystal structure of a full-length beta-catenin. *Structure*, **16**: 478-487.
- XU W, KIMELMAN D (2007). Mechanistic insights from structural studies of beta-catenin and its binding partners. *J Cell Sci*, **120**: 3337-3344.
- YOSHIMURA A, KANEKO T, KATO Y, GOLENBOCK DT, HARA Y (2002). Lipopolysaccharides from periodontopathic bacteria *Porphyromonas gingivalis* and *Capnocytophaga ochracea* are antagonists for human toll-like receptor 4. *Infect Immun*, **70**: 218-225.
- ZHANG Q, CHEN B, ZHU D, YAN F (2016). Biomarker levels in gingival crevicular fluid of subjects with different periodontal conditions: A cross-sectional study. *Arch Oral Biol*, **72**: 92-98.
- ZHANG R, OYAJOBİ BO, HARRIS SE, CHEN D, TSAO C, H.-W. DENG HW, ZHAO M (2013). Wnt/ β -catenin signaling activates bone morphogenetic protein 2 expression in osteoblasts. *Bone*, **52(1)**: 145-156.
- ZHAO H, HUANG Y, TAO J (2016). ST1926 Attenuates Steroid-Induced Osteoporosis in Rats by Inhibiting Inflammation Response. *J Cell Biochem*. **118(8)**: 2072-2086.
- ZHAO Y, ZHANG C, HUANG Y, YU Y, LI R, LI M, LIU N, LIU P, QIAO J (2015). Up-regulated expression of WNT5a increases inflammation and oxidative stress via PI3K/AKT/NF- κ B signaling in the granulosa cells of PCOS patients. *J Clin Endocrinol Metab*, **100**: 201-211.
- ZHU L, YAO Y, LIU J, WANG J, XIE H (2019). Expression of β -catenin and MMP-8 in gingival crevicular fluid and gingival tissue indicates the disease severity of patients with chronic periodontitis. *Exp Ther Med*, **18(3)**: 2131-2139.

ZYCHLINSKY A, FITTING C, CAVAILLON JM, SANSONETTI PJ (1994). Interleukin 1 is released by murine macrophages during apoptosis induced by *Shigella flexneri*. *J. Clin. Invest.* **94**: 1328-1332.

EKLER

EK-1: Etik Kurul Onayı

	T.C. ANKARA ÜNİVERSİTESİ Diş Hekimliği Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu	
Konu : Etik Kurul Hk. Sayı : 36290600/52		26.05 2017
	Sayın Dr. Dt. Canan ÖNDER A.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi	
	Dr. Dt. Canan ÖNDER tarafından gönderilen "Kronik ve Agresif Periodontitis Hastalarında Wnt/B-cathenin Sinyal Yolağının Değerlendirilmesi" konulu çalışma, Etik Kurulumuz tarafından incelenmiş ve araştırma etiği açısından uygun bulunmuştur. Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.	
	 Prof. Dr. Murat AKKAYA Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı	
Eki: 3 sayfa		

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Kronik ve Agresif Periodontitis Hastalarında Wnt/B-catherin Sinyal Yolağının Değerlendirilmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

+ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	ANKARA ÜNİVERSİTESİ DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
	AÇIK ADRESİ:	A.Ü. DİŞ HEK. FAKÜLTESİ BEŞEVLER / ANKARA
	TELEFON	296 57 37
	FAKS	
	E-POSTA	disetik@ankara.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	DR. DT CANAN ÖNDER	
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	A.Ü. DİŞ HEK. FAK. PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI	
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	ANKARA	
	VARSA İDARI SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI		
	DESTEKLEYİCİ		
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ		
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	
		FAZ 2	
		FAZ 3	
		FAZ 4	
		Gözlemsel ilaç çalışması	
		Tıbbi cihaz klinik araştırması	
		Biyolojik türün, geleneksel ve tamamlayıcı tıp uygulaması	
		In vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları	
		İlaç dışı klinik araştırma	X
		Diğer ise belirtiniz	
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ X	ÇOK MERKEZLİ ULUSAL ULUSLARARASI

Etik Kurul/Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Murat AKKAYA
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Kronik ve Agresif Periodontitis Hastalarında Wnt/B-catenin Sinyal Yolağının Değerlendirilmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dil
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	17.03.2017		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama		
	SIGORTA	☐		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐		
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐		
	İLAN	☐		
	YILLIK BİLDİRİM	☐		
	SONUÇ RAPORU	☐		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐		
	DİĞER:	☐		
	Karar No: 08/03	Tarih: 19.04.2017		

Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri hakkında alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinin etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU		
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu	
BASKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Murat AKKAYA	

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkisi	Katılım *	İmza
Prof. Dr. Murat AKKAYA	Periodontoloji	A.Ü.Diş H.F.	E ☐ K ☐	E ☐ H ☐	E ☐	
Prof. Dr. H. V. Diş Tıp. Kd. Alb Yavuz S. AYDINTUĞ	Ağız, Diş, Çene Cerrahisi	Gülhane Ask. Tıp Akadem. Diş H.F.	E ☐ K ☐	E ☐ H ☐	E ☐	
Prof. Dr. Ayşegül KÖKLÜ	Ortodonti	A.Ü.Diş H.F.	E ☐ K ☐	E ☐ H ☐	E ☐	
Prof. Dr. Fatma Gül ZİRAMAN	Endodonti	A.Ü.Diş H.F.	E ☐ K ☐	E ☐ H ☐	E ☐	
Prof. Dr. Serpil ALTUNDOĞAN	Ağız, Diş, Çene Cerrahisi	A.Ü.Diş H.F.	E ☐ K ☐	E ☐ H ☐	E ☐	
Prof. Dr. Sadullah ÜÇTAŞLI	Protetik Diş Ted.	A.Ü.Diş H.F.	E ☐ K ☐	E ☐ H ☐	E ☐	
Prof. Dr. Şaziye SARI	Pedodonti	A.Ü.Diş H.F.	E ☐ K ☐	E ☐ H ☐	E ☐	

Etik Kurul Başkanı
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Murat AKKAYA
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, lezasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Kronik ve Agresif Periodontitis Hastalarında Sinyal Yolağının Değerlendirilmesi		Wnt/B-cathenin	
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU				

Prof. Dr. Hatice GÖKALP	Ortodonti	A.Ü.Diş H.F.	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Prof. Dr. Adil NALÇACI	Diş Hast. Ve Tedavisi	A.Ü.Diş H.F.	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Prof. Dr. Kaan ORHAN	Ağız, Diş ve Çene Rady.	A.Ü.Diş H.F.	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Doç. Dr. Bilge PEHLIVANOĞLU	Fizyoloji	H.Ü. Tıp F.	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Av. Mehmet Tevfik GÖKSEYİTOĞLU	Hukuk	Serbest	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Doç. Dr. Sevil Özger İLHAN	Farmakoloji	G.Ü. Tıp F.	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Dr. Sevilay KARAHAN	Bioistatistik	H.Ü. Tıp F.	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Kim. Müh. Orhan YILMAZ	Bilgisayar	A.Ü.Diş H.F.	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐

*:Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Murat AKKAYA
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.



T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
Diş Hekimliği Fakültesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu



Konu : Etik Kurul Hk.
Sayı : 36290600/ 75

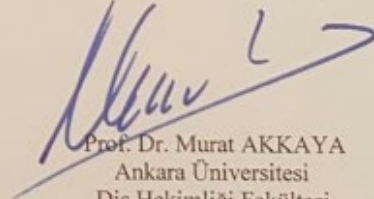
11.07.2017

Sayın Dr. Dt. Canan ÖNDER
A.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi
Periodontoloji Anabilim Dalı
Öğretim Görevlisi

İlgi: 14.06.2017 tarihli dilekçeniz.

İlgi tarihli dilekçenizde belirttiğiniz üzere Etik Kurulumuzun 19.04.2017 tarihli ve 08/03 karar sayısı ile kabul ettiğimiz, Dr. Dt. Canan ÖNDER tarafından yürütülecek olan “Kronik ve Agresif Periodontitis Hastalarında Wat/B-Cathenin Sinyal Yolağının Değerlendirilmesi” konulu çalışmanızın yürütücüsünün Prof. Dr. Meral GÜNHAN olarak değiştirilmesine, oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.


Prof. Dr. Murat AKKAYA
Ankara Üniversitesi
Diş Hekimliği Fakültesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurul
Başkanı

Ek-2: Gönüllü Olur Formu

ÇALIŞMANIN ADI: *Kronik ve agresif periodontitis hastalarında cerrahi olmayan periodontal tedavinin Wnt/ β -catenin yolağı üzerine etkisinin değerlendirilmesi*

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

LÜTFEN DİKKATLİCE OKUYUNUZ!!!

Bu çalışmaya katılmak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışmada yer almayı kabul etmeden önce çalışmanın ne amaçla yapılmak istendiğini anlamanız ve kararınızı bu bilgilendirme sonrası özgürce vermeniz gerekmektedir. Size özel hazırlanmış bu bilgilendirmeyi lütfen dikkatlice okuyunuz, sorularınıza açık yanıtlar isteyiniz.

Diş kaybıyla seyreden dişeti hastalığının sebepleri henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Dişeti hastalıklarının etkeni çok faktörlü ve oldukça karmaşıktır. Bunun sebebi, asıl nedenin mikrop tabakası içerisinde yer alan zengin bir mikroorganizma topluluğu olması yanında, konak cevabını yönlendiren birçok genetik, çevresel ve sistemik faktörün dişeti hastalığının başlamasında, ilerlemesinde ve şiddetinde rol oynamasıdır. Dişeti hastalıklarının tedavisinde ağız bakımı eğitimi ile diş yüzeyi temizliği ve kök yüzeyi düzleştirilmesi işlemlerini içeren cerrahisiz dişeti hastalığı tedavisi çoğu hastada uzun dönemde klinik olarak başarılı olmaktadır. Kronik ve agresif periodontitis farklı karaktere sahip hastalıklardır. İki hastalık arasındaki farklılıkların belirlenmesi tedavi süreci açısından önemlidir. Bu nedenle çalışmamızda kronik ve agresif periodontitis tanısı konmuş bireylerden alınan örneklerde savunma sistemi ile ilgili verilerin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Hastalık grupları için periodontal hastalık nedeniyle diş çekimine karar verilen dişlerin çekimi sırasında etrafındaki etkilenmiş doku alınarak biyopsi materyali olarak kullanılacaktır. Sağlıklı kontrol grubu için protetik ve estetik nedenlerle gingivektomi ya da kron boyu uzatma endikasyonu konulan dişlerin etrafından uzaklaştırılan dokular biyopsi materyali olarak kullanılacaktır.

Araştırmanın toplam süresi 2 yıldır. Fakat sizin araştırmaya dahil olma süreniz periodontal tedavi öncesinde örneklerin alınmasıyla sona ermektedir. Araştırmamıza, periodontal olarak sağlıklı 15 birey ile kronik ve agresif periodontitis tanısı konmuş 45'er hasta olmak üzere sistemik olarak sağlıklı toplam 45 birey dahil edilecektir. Sizinle ilgili bulgu ve veriler kullanılmakla birlikte kimlikleriniz gizli tutulacaktır.

Gerekli tedaviler çalışmaya dahil olmamanız durumunda da aynen uygulanacaktır. Her hastaya özgü alınan plak, tükürük, dişeti oluğu sıvısı ve dişeti örneklerinin tedaviye olumlu veya olumsuz hiçbir etkisi olmamakla birlikte dişeti hastalığının oluşum nedenlerinin açıklanmasında bilimsel açıdan büyük önem taşımaktadır.

Çalışmaya katılmayı reddetme ve/veya herhangi bir zamanda vazgeçme hakkına sahipsiniz. Vazgeçme veya reddetme durumunda da tedavi ve bakımlarınız normal olarak gerçekleştirilecektir. Araştırmada yer almanız durumunda yapılacak tetkik ve tahliller size veya bağlı olduğunuz kuruluşa herhangi bir mali yük getirmeyecektir.

Yapılacak her tür tetkik, fizik muayene ve diğer araştırma masrafları size veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kurum veya kuruluşa ödetilmeyecektir. Bu araştırmada yer almanız nedeniyle size hiçbir ödeme yapılmayacaktır.

Çalışma süresi içinde herhangi bir yakınmanızı bildirmek veya çalışmadan çıkmak istediğinizde Dt. Zeliha Güney ile irtibat kurabilirsiniz.

Tel : Dr. Güney: 0 536 669 89 21

Çalışmaya Katılma Onayı:

GÖNÜLLÜNÜN		İMZASI
ADI & SOYADI		
ADRESİ		
TEL. & FAKS		
TARİH		

VELAYET VEYA VESAYET ALTINDA BULUNANLAR İÇİN VELİ VEYA VASİNİN		İMZASI
ADI & SOYADI		
ADRESİ		
TEL. & FAKS		
TARİH		

ARAŞTIRMA EKİBİNDE YER ALAN VE YETKİN BİR ARAŞTIRMACININ		İMZASI
ADI & SOYADI		
TARİH		

GEREKTİĞİ DURUMLARDA TANIK		İMZASI
ADI & SOYADI		
GÖREVİ		
TARİH		

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı: Zeliha
Soyadı: Güney
Doğum yeri ve tarihi: Ankara, 20/07/1989
Uyruğu: TC
Medeni durumu: Bekar
İletişim adresi ve telefonu: Esertepe Mah. Barışyolu Cad. Alımlı Sok. 47/1
Keçiören/Ankara, 0536 669 8921

II- Eğitimi

2015-2022? Ankara Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Periodontoloji
Anabilim Dalı- Ankara
2008-2013 Ankara Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi-Ankara
2003-2007 Cumhuriyet Anadolu Lisesi-Ankara
1995-2003 Yalçın Eskiyan İlköğretim Okulu
Yabancı dili: İngilizce

III- Ünvanları

Dt

IV- Mesleki Deneyimi

2015-2022? Doktora öğrencisi (Tam zamanlı), Ankara Üniversitesi Diş
Hekimliği Fakültesi, Periodontoloji Anabilim Dalı-Ankara, Türkiye

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

International Association of Dental Research
Türk Periodontoloji Derneği
European Association for Osseointegration
European Federation of Periodontology
Türk Diş Hekimleri Birliği
Kök Hücre ve Hücresel Tedaviler Derneği
ITI International Team for Implantology

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayınları:

- Aşırı Gingival Görünümün Azaltılmasında Dudak Repozisyonu Tekniği: Olgu Sunumu. Şivge Kurgan, Ardita Koçi, Elif Ünsal, Mine Cambazoğlu, **Zeliha Güney**. Estetik ve İmplant 2016;11(34):30-34.
- The Effects of Nonsurgical Periodontal Therapy on Serum Levels of Procalcitonin in Patients with Chronic and Aggressive Periodontitis. Önder C, Kurgan S, Balcı N, Tayman M.A, **Güney Z**, Serdar M.A, Günhan M. PONTE International Scientific Researchers Journal. 2016; 72(4):150-172. (AHCI)
- Meth Mouth’lu Hastanın Kapsamlı Dental Rehabilitasyonu: Vaka Sunumu. **Zeliha GÜNEY**, Burcu BATAK, Ali URSAVAŞ, Canan ÖNDER, Şivge KURGAN, Adnan TEZEL Atatürk Üniv. Diş Hek. Fak. Derg. 2016; 26(2):296- 300. (TÜBİTAK/ULAKBİM)
- Vascular Endothelial Growth Factor Levels (VEGF) in Gingival Biopsies of Patients with Chronic or Aggressive Periodontitis. Canan ONDER , Sivge KURGAN, Nur BALCI, **Zeliha GÜNEY**, Muhittin A. SERDAR, Omer GUNHAN, Meral GUNHAN. J. Ponte - Jul 2016 - Volume 72 - Issue 7doi: 10.21506/j.ponte.2016.7.19. (AHCI)
- Peri-implantitis Tedavisi II: Cerrahi Tedavi. **Zeliha GÜNEY**, Murat AKKAYA. Türkiye Klinikleri Periodontoloji Dergisi Peri-implantitis Özel Sayısı. 2017;3(2):75-80. (TÜBİTAK/ULAKBİM)
- A Disintegrin-like and Metalloproteinase with Thrombospondin-1 (ADAMTS-1) Levels in Gingival Crevicular Fluid Correlate with Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A), Hypoxia-Inducible Factor-1 α (HIF-1 α), and Clinical Parameters in Patients with Advanced Periodontitis. Ayşe TAYMAN, Şivge KURGAN, Canan ÖNDER, **Zeliha GÜNEY**, Muhittin A. SERDAR, Alpdoğan KANTARCI, Meral GÜNHAN. (JOP-18-0195.R3) (SCI)

Sözlü Sunumlar ve Poster Sunumları:

- Meth Mouth’lu Hastanın Dental Rehabilitasyonu: Vaka Sunumu **Zeliha Güney**, Ali Ursavaş, Şivge Kurgan, Canan Önder, Adnan Tezel Türk Periodontoloji Derneği 45. Bilimsel Kongresi. Kasım, 2015; Ankara, Türkiye (Poster Sunumu)

- Agresif ve Kronik Periodontitis Hastalarında Cerrahi Olmayan Periodontal Tedavinin Serum Prokalsitonin Düzeyine Etkisi.
Canan Önder, Şivge Kurgan, Nur Balcı, Ayşe Tayman, **Zeliha Güney**, Muhittin A. Serdar, Meral Günhan. Türk Periodontoloji Derneği 46. Bilimsel Kongresi. Mayıs 2016, İzmir, Türkiye (Sözlü Sunum)
- Treating Gingival Recession by Using Two Double Papilla Flap And Coronally Advenced Flap With Root Treatment: Case Report
Necmettin YETA, Elif Naz YETA, **Zeliha GÜNEY**, M. Murat AKKAYA, Bade SONAT 22th Congress of the Balkan Stomatological Society (BaSS) Nisan 2017, Thessaloniki, Yunanistan (Poster Sunumu)
- Periodontal Status of Smokers and the Effect of Smoking on Non-Surgical Periodontal Therapy: A Clinical and Histological Evaluation.
Z. Güney, H.M. Bilginer, Ş. Kurgan, M. Afandiyev, M. Günhan, O. Gunhan, D.N. Tatakis. EuroPerio9 - Haziran 2018, Amsterdam, Hollanda. (Poster Sunumu)
- Treatment of Aphthous Ulcer with Aromatherapy: Case Report
Zeliha Güney, Canan Önder, Tuğba Çalık Durmaz, Hasan Yıldız. 24th Congress of the Balkan Stomatological Society (BaSS) Mayıs 2019, Tiran, Arnavutluk (Poster Sunumu)
- Kronik ve Agresif Periodontitis Hastalarında Wnt/B-Catenin Sinyal Yolağının Değerlendirilmesi
Z. Güney, Ş. Kurgan, C. Önder, A. Tayman, Ö. Günhan, A. Kantarcı, M. Serdar, M. Günhan. Türk Periodontoloji Derneği 49. Bilimsel Kongresi. Ekim 2019, Antalya Türkiye. (Sözlü Sunum)
- Liken Planus İmplant Sağkalımını Nasıl Etkiler?: Vaka Raporu
Dt. Zeliha GÜNEY, Dt. Görkem ÜNAL, Prof. Dr. Meral GÜNHAN. Türk Periodontoloji Derneği 49. Bilimsel Kongresi. Ekim 2019, Antalya Türkiye. (Poster Sunumu)
- IL1 β , IL10, ADMA, SDMA, and Homoarginine levels in Periodontitis Patients.
Zeliha Güney, Sivge Kurgan, Canan Önder, Cavid Mammadov, Muhittin Serdar, Meral Günhan. IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition,

March 2020, Washington, USA. (e-poster Sunumu) (Kongre Covid-19 pandemisi nedeniyle iptal edilmiştir)

Kitaplar ve Kitap Bölümleri:

- Diş Hekimliği ve Fonksiyonel Estetik
Prof. Dr. Bülent Şermet, Prof. Dr. Elif Ünsal, Dr. Evren Öztaş, Prof. Dr. Gülsüm Ak, Prof. Dr. Mine Cambazoğlu, Dt. Seyhan Akar, **Dt. Zeliha Güney**, Dr. Sinem Savran, Dr. Şivge Kurgan, Yrd. Doç. Dr. Sabiha Zelal Başkan Ülkü. Dt. Mustafa Berkerecioğlu. Vestiyer Yayın Grubu, 2018
- Romatoid Hastalıklar ve Diş Hekimliği
Prof. Dr. Ömer Günhan, Doç. Dr. Şivge Kurgan, Yrd Doç. Dr. Devrim Kahraman, **Dr. Zeliha Güney** ve Dr. Fatma Karacaoğlu. TÜRK DİŞHEKİMLERİ BİRLİĞİ YAYINLARI Eğitim Dizisi: 26. ISBN 1. Baskı. Türk Dişhekimleri Birliği Kızılırmak Mah. 1446. Cad. Alternatif İş Merkezi No:12/38 06530 Çukurambar, Çankaya/ANKARA
- Periodontal Tedavide Antibiyotik Kullanımı
Fatma KARACAOĞLU, Canan ÖNDER, **Zeliha GÜNEY**. Güncel Periodontoloji ve Ortodonti Çalışmaları I. İlter UZEL, Cenk AYTAÇ. Akademisyen Yayın Evi, 2019; bölüm 3; sf21-37. ISBN 978-605-258-306-7.
- Periodontal hastalıkların etiyolojisi; konak-bakteri etkileşimi.
Günhan M, **Güney Z**, Balkan B. Tezel A, editör. Periodontal Hastalıkların Etiyolojisi; Genel Bakış. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2020. p.9-16.

Kurslar:

- Ankara Üniversitesi Sürekli Eğitim Merkezi, Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası Eğitim Programı. 08-17 Mayıs 2017, Ankara, Türkiye
- Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi, Kök Hücre Bölge Toplantıları-1. Mart 2018, Konya, Türkiye.
- 2019 CED-IADR Summer School “Methods in Dental and Orofacial Tissues Research” İn The University Of Zagreb School of Dental Medicine & School of Medicine/Croatian Institute for Brain Research in Zagreb, Croatia from July 1-5, 2019.
- İmplant Üstü Protez, 25-26 Ocak 2020, İstanbul, Türkiye.