



**T.C.
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ**

**PERİODONTAL HASTALIK VE SAĞLIKTA DİŞ ETİ OLUĞU
SIVISI VE SERUM ERBB4/NEUREGULİN-4 SEVİYELERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dt. Bilge MERACI

**PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Doktor Öğretim Üyesi Şadiye GÜNPINAR**

Bu çalışma Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. (Proje numarası: 2018.06.05.1310)

**MAYIS 2019
BOLU**

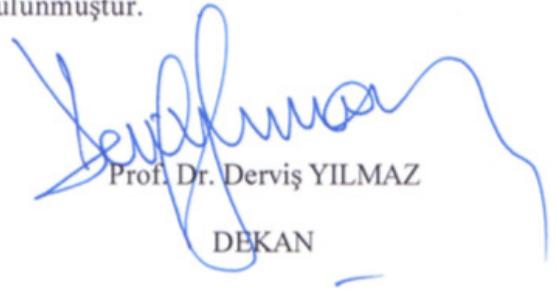
T.C.
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
Tez Onay Belgesi

Tezin Başlığı : Periodontal Hastalık ve Sağlıklı Dis Et.
Olucu Sıvısı ve Serum ErbB4-Neuregulin
Tezin Savunma Tarihi : Seriviyenin Değerlendirilmesi
Tezin Danışmanı : Doktor Öğretim Üyesi Sadıye Günpınar

Jüri Başkanı : Doç. Dr. Serhat KÖSEÖZÜ.....
Üye : Dr. Öğr. Üyesi Serki Güler.....
Üye : Dr. Öğr. Üyesi Sadıye Günpınar.....

DEKANLIK ONAYI

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.


Prof. Dr. Derviş YILMAZ
DEKAN

ÖZET

PERİODONTAL HASTALIK VE SAĞLIKTA DIŞ ETİ OLUĞU SIVISI VE SERUM ERBB4 / NEUREGULIN-4 SEVİYELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Bu klinik çalışmada, periodontal hastalık ve sağlıklı diş eti oluşu sıvısı (DOS) ve serum Erb-b2 reseptör tirozin kinaz 4 (ErbB4) ve neuregulin (Nrg)-4 seviyelerinin değerlendirilmesi amaçlandı. İlave olarak, ilgili sitokinlerin birbirleriyle ve klinik parametrelerle ilişkisi ve cerrahi olmayan periodontal tedavi (COPT) sonrası bu parametrelerdeki değişiklikler incelendi.

Paralel dizayn edilmiş bu çalışmaya sistemik olarak sağlıklı ve obez olmayan gingivitisli (G, n = 20), evre II düzey B periodontitisli (P1, n = 20), evre III düzey B periodontitisli (P2, n = 20) ve periodontal olarak sağlıklı (S, n = 20) bireyler dahil edildi. Bireylere ait klinik periodontal ölçümler ile DOS ve serum örnekleri COPT öncesi alınarak tedavi sonrası 1. ayda tekrarlandı. Örneklerle ait ErbB4, Nrg4, interlökin (IL)-6, IL-10, nitrik oksit sentaz (NOS)-2 ve arjinaz (Arg)-1 seviyeleri “enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA) ile analiz edildi.

DOS ErbB4 ve Nrg4 total miktarlarının G, P1 ve P2 gruplarında S grubundan anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edildi ($p<0,01$). DOS IL-10 miktarı ise S grubunda diğer gruplardan anlamlı derecede yüksekti ($p<0,01$). Bununla birlikte, DOS IL-6 total miktarı gruplar arasında farklı değildi ($p>0,05$). DOS IL-6/IL-10 oranının periodontal hastalığı olan kişilerde sağlıklı bireylere göre anlamlı derecede yüksek olduğu saptandı ($p<0,01$). Serum ErbB4 düzeyleri, P2 grubunda S ve P1 gruplarına göre daha yüksek bulundu ($p=0,05$). Diğer taraftan, gruplar arasında serum Nrg4 konsantrasyonları açısından anlamlı fark yoktu. S grubunda serum NOS2 düzeyleri diğer gruplardan anlamlı derecede daha düşükken, serum Arg1 düzeyleri ise daha yüksekti ($p<0,05$). Ek olarak, DOS ErbB4 ve Nrg4 total miktarları ile tüm klinik parametreler ve DOS IL-6/IL-10 oranı arasında pozitif yönlü korelasyon olduğu tespit edildi. Periodontal tedavi sonrası 1. ayda G, P1 ve P2 gruplarında DOS ErbB4 ve Nrg4 total miktarlarının azaldığı belirlendi ($p<0,05$). Bununla birlikte, serum ErbB4 ve Nrg4 düzeylerinde anlamlı bir değişim yoktu. COPT uygulanan bireylerde tedavi sonrası serum NOS2 konsantrasyonu ve DOS IL-6/IL-10 oranının azaldığı, G ve P2 gruplarındaki bireylerde ise DOS IL-10 total miktarının arttığı belirlendi ($p<0,05$).

Bu bulgular ışığında, ErbB4 ve Nrg4’ün diş eti enflamasyonunun çözülme aşamasında rol oynayabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmanın sınırları dahilinde, ErbB4 ve Nrg4’ün periodontal hastalık patogeneğinde önemli birer biyobelirteç olabileceği sonucu çıkarılabilir.

Anahtar kelimeler: diş eti oluşu sıvısı, ErbB-4, makrofaj, neuregulin-4, periodontal hastalık.

ABSTRACT

ASSESSMENT OF GINGIVAL CREVICULAR FLUID AND SERUM ERBB4/NEUREGULIN-4 LEVELS IN PERIODONTAL DISEASE AND HEALTH

This clinical trial aimed to evaluate gingival crevicular fluid (GCF) and serum Erb-b2 receptor tyrosine kinase 4 (ErbB4) and neuregulin (Nrg)-4 levels in periodontal health and disease. The association of these molecules between each other and with clinical parameters and also the alterations in these biochemical and clinical parameters after non-surgical periodontal therapy (NSPT) were determined.

Systemically healthy and non-obese patients with gingivitis (G, n = 20), stage II grade B periodontitis (P1, n = 20), stage III grade B periodontitis (P2, n = 20) and periodontally healthy individuals (H, n = 20) were included in this parallel-design study. Clinical measurements and samples of gingival crevicular fluid (GCF) and serum were obtained at baseline and repeated at 1st month after NSPT. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine levels of ErbB4, Nrg4, interleukin (IL)-6, IL-10, nitric oxide synthase (NOS)-2 and arginase (Arg)-1.

The total amounts of GCF ErbB4 and Nrg4 were significantly higher in the G, P1 and P2 groups than the H group ($p < 0,01$). The GCF total amount of IL-10 was significantly higher in H group than the other groups ($p < 0,01$). However, there was no statistical difference between groups in terms of the GCF total amount of IL-6 ($p > 0,05$). The GCF IL-6/IL-10 ratio were found to be significantly higher in the subjects with periodontal disease than those in periodontally healthy individuals ($p < 0,01$). Serum ErbB4 levels were higher in P2 group than in H and P1 groups ($p = 0,05$). On the other hand, there was no significant difference between groups in terms of serum concentrations of Nrg4. Serum NOS2 levels were significantly lower whereas serum Arg1 levels were higher in H group among the other groups ($p < 0,05$). Additionally, the GCF total amount of ErbB4 and Nrg4 was found to have a positive and significant correlation with all clinical parameters and GCF IL-6/IL-10 ratio. The total amount of GCF ErbB4 and Nrg4 were significantly decreased ($p < 0,05$), on the other hand serum concentrations of ErbB4 and Nrg4 did not change at 1st month after NSPT. Serum NOS2 concentrations and GCF IL-6/IL-10 ratios were decreased, while the total amounts of GCF IL-10 were increased after NSPT in both the G and P2 groups ($p < 0,05$).

In the shade of these aforementioned findings, ErbB4 and Nrg4 may have essential roles in resolution stage of gingival inflammation. Within the limits of this study, it can be concluded that ErbB4 and Nrg4 may be utilized as possible novel biomarkers for periodontal disease.

Keywords: ErbB-4, gingival crevicular fluid, macrophage, neuregulin-4, periodontal disease.

TEŞEKKÜR

Hayatım boyunca desteklerini esirgemeyen ve yanımda olan canım aileme,

Uzmanlık eğitimim boyunca her konuda bana yardımcı olan, yoluma ışık tutan, insani ve ahlaki değerleri ile örnek edindiğim kıymetli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Şadiye GÜNPINAR'a, bilgi ve deneyimlerini hiç esirgmeden paylaşan değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Gülbahar USTAOĞLU'na ve tüm bölüm hocalarıma,

Çalışmamızın laboratuvar aşamalarındaki katkılarından dolayı Selçuk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Araştırma Merkezi'nde görevli Dr. Niyazi DÜNDAR'a,

Her konuda yardımcı olan ve bilgi ve tecrübelerini esirgemediğim benimle paylaşan kıymetli dostlarım Tuğçe PAKSOY, Hüsnüye BİLGE, Mehmet Selim YILDIZ ve Mehmet Cihan ŞENGÜN'e

Her zaman yanımda olan ve klinikte keyifle çalışmamı sağlayan değerli dostlarım Özge UYSAL, Uğur ALPAR, Cemre VERGİLİ YILMAZ, Zeynep UĞURAĞ, Mert KARAŞ, Ebru ÖZKAN BÜTÜN, Ayşe Sinem SEVİNÇ ve bölümdeki diğer tüm asistan arkadaşlarıma,

Özveriyle ve güleryüzle çalışan kliniğimizin kıymetli personellerine,

Uzmanlık eğitimim boyunca bana yardımcı olan fakültemizin diğer anabilim dallarındaki tüm hocalarıma, asistan arkadaşlarıma ve tüm fakülte personeline,

Projemizi desteklediği için Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne,

Sevgili Volkan Çağlar YILDIRAN ve ailesine,

Teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar	viii
ŞEKİLLER	ix
FİGÜRLER	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Periodontal Hastalıklar ve Durumlar	5
2.2. Periodontal Hastalıkların Patogenezi	10
2.3. Periodontitiste Makrofajların Rolü	14
2.4. ErbB4 ve Nrg4	18
2.4.1. ErbB4 ve Nrg4'ün Enflamatuvar Hastalıklardaki Rolü	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	22
3.1. Çalışma Grupları	22
3.2. Klinik Periodontal Değerlendirme	23
3.2.1. Gingival indeks (Gİ)	24
3.2.2. Plak indeksi (Pİ)	25
3.2.3. Papil kanama indeksi (PKİ)	25
3.2.4. Sondlamada kanama (SK)	26
3.2.5. Sondlama derinliği (SD)	26
3.2.6. Klinik ataçman kaybı (KAK)	26
3.3. Biyokimyasal Değerlendirme	27
3.3.1. Diş eti oluğu sıvısı (DOS) örneklerinin elde edilmesi	27
3.3.2. Serum örneklerinin elde edilmesi	28
3.4. Cerrahi Olmayan Periodontal Tedavi	28

3.5. Laboratuvar İşlemleri	29
3.5.1. DOS ErbB4, Nrg4, IL-6 ve IL-10 düzeylerinin belirlenmesi	29
3.5.2. Serum ErbB4, Nrg4, NOS2 ve Arg1 düzeylerinin belirlenmesi	31
3.6. İstatistiksel Analiz	32
4. BULGULAR	33
4.1. Klinik Bulgular	34
4.1.1. Tüm ağız klinik periodontal parametreler	34
4.1.2. Örnek alınan diş bölgelerine ait klinik periodontal parametreler	36
4.2. Biyokimyasal Bulgular	39
4.3. Korelasyon Analizleri	47
4.3.1. Çalışma geneli klinik ve biyokimyasal korelasyonlar	47
4.3.2. Çalışma geneli biyokimyasal korelasyonlar	49
5. TARTIŞMA	52
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	63
KAYNAKLAR	66
EKLER	81
EK 1: BAİBÜ Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı	81
EK 2: Bilgilendirilmiş gönüllü olur formu	82
EK 3: Anamnez formu	83
EK 4: Klinik periodontal parametre değerlendirme formu	84
ÖZGEÇMİŞ	85

TABLÖLAR

Tablo 2.1: Periodontitis evreleri	9
Tablo 2.2: Periodontitis düzeyleri	10
Tablo 4.1: Çalışmada yer alan bireylere ait demografik veriler, sosyoekonomik bilgiler, kişisel alışkanlıklar, VKİ ve mevcut diş sayısı verileri	34
Tablo 4.2: Çalışma gruplarındaki bireylere ait tüm ağız klinik periodontal parametreler	35
Tablo 4.3: Çalışma gruplarındaki bireylerin örnek alınan diş bölgelerine ait sondlama derinliği ve klinik ataçman kaybı verileri	36
Tablo 4.4: Çalışma gruplarındaki bireylerin örnek alınan diş bölgelerine ait klinik periodontal parametre ve DOS hacim değerleri	38
Tablo 4.5: Çalışma gruplarındaki bireylere ait başlangıç ve tedavi sonrası 1. aydaki DOS Erbb4, Nrg4, IL-6, IL-10 total miktarları ve IL-6/IL-10 oranı	40
Tablo 4.6: Çalışma gruplarındaki bireylere ait başlangıç ve tedavi sonrası 1. aydaki DOS Erbb4, Nrg4, IL-6 ve IL-10 konsantrasyonları	41
Tablo 4.7: Çalışma gruplarının başlangıç ve tedavi sonrası 1. aydaki serum Erbb4, Nrg4, NOS2 ve Arg1 konsantrasyonları	43
Tablo 4.8: Başlangıç DOS bulguları ile örnek alınan diş bölgelerine ait klinik parametreler arasındaki Spearman korelasyonu	47
Tablo 4.9: Başlangıç serum bulguları ile tüm ağız klinik parametreler arasındaki Spearman korelasyonu	48
Tablo 4.10: Başlangıç biyokimyasal parametrelerin kendi arasındaki Spearman korelasyonu	49

ŞEKİLLER

Şekil 2.1: Periodontal hastalık ve durumlar	7
Şekil 2.2: Gingival sağlık ve gingival hastalık/durumların sınıflandırması	8
Şekil 3.1: Çalışma planı	24



FIGÜRLER

- Figür 4.1:** DOS ErbB4, Nrg4, IL-6 ve IL-10 total miktarları ile IL-6/IL-10 oranının gruplara ve zamana göre dağılımları 45
- Figür 4.2:** Serum ErbB4, Nrg4, NOS2 ve Arg1 konsantrasyonlarının gruplara ve zamana göre dağılımları 46



SİMGELER VE KISALTMALAR

AIDS	: Edinilmiş Bağışıklık Eksikliği Sendromu
ANOVA	: Varyans analizi
Arg	: Arjinaz
BAİBÜ	: Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi
BAK	: BCL-2 antagonist/ <i>killer</i>
COPT	: Cerrahi olmayan periodontal tedavi
CRP	: C-reaktif protein
DOS	: Diş eti oluşu sıvısı
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
ELISA	: Enzim-bağlı immunosorbent analiz
ErbB4	: Erb-b2 reseptör tirozin kinaz-4
G	: Gingivitis grubu
Gİ	: Gingival indeks
GM-CSF	: Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör
HB-EGF	: Heparin bağlayıcı EGF-benzeri büyüme faktörü
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
hsCRP	: Yüksek duyarlılık C-reaktif protein
IFN	: İnterferon
IL	: İnterlökin
IL-1RA	: IL-1 reseptör antagonisti
İD	: İnsülin direnci
KAK	: Klinik ataçman kaybı
KYT	: Kök yüzey temizliği
L	: Litre
LPS	: Lipopolisakkarit
maks	: Maksimum
MetS	: Metabolik sendrom
MCP	: Monosit kemotaktik protein
min	: Minimum
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
MMP	: Matriks metalloproteinaz
MPBI	: “ <i>Multiplexed bead immunoassay</i> ”
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
n	: Birey sayısı
ng	: Nanogram
NK	: “ <i>Natural killer</i> ”, doğal öldürücü hücre
nm	: Nanometre
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
Nrg4	: Neuregulin-4
OPG	: Osteoprotegerin
ort	: Ortalama

PBS	: “ <i>Phosphate buffered saline</i> ”
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
Pİ	: Plak indeksi
PG	: Prostaglandin
pg	: Pikogram
PKİ	: Papil kanama indeksi
PKOS	: Polikistik over sendromu
PMNL	: Polimorfonükleer lökosit
P1	: Orta şiddetli periodontitis (evre II, düzey B) grubu
P2	: Şiddetli periodontitis (evre III, düzey B) grubu
r	: Korelasyon katsayısı
RANK	: Nükleer faktör-kappa B reseptör aktivatörü
RANKL	: Nükleer faktör-kappa B reseptör aktivatörü ligandı
rpm	: Dakikaki devir sayısı
RTK	: Reseptör tirozin kinaz
S	: Sağlıklı grup
SD	: Sondlama derinliği
SK	: Sondlamada kanama
sn	: Saniye
SPSS	: Sosyal Bilimler İçin İstatistik Programı
ss	: Standart sapma
TACE	: TNF-alfa dönüştürücü enzim
TGF	: Transforme edici büyüme faktörü
Th	: “ <i>T-helper</i> ”, yardımcı T hücresi
TL	: Türk lirası
TNF	: Tümör nekroz faktörü
TR-IFMA	: “ <i>Time-resolved immuno fluorometric assay</i> ”
T₀	: Başlangıç
T₁	: Birinci ay
T2DM	: Tip 2 diabetes mellitus
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VKİ	: Vücut kitle indeksi
WBC	: “ <i>White blood cell</i> ”, beyaz kan hücresi
4ICD	: ErbB4 hücre içi alanı
µl	: Mikrolitre
° C	: Santigrat derece

1. GİRİŞ

En sık görülen oral hastalık olan periodontal hastalık, dişleri çevreleyen destek dokuların zarar görmesi ile karakterize enflamatuvar hastalıktır (1). Periodontal hastalıklar klinik özelliklerine göre gingivitis ve periodontitis olarak ayrılabilir. Gingivitis mikrobiyal dental plak varlığına bağlı gelişen, destek doku kaybının görülmediği diş eti enflamasyonudur. Etkenin oral hijyen uygulamaları ile uzaklaştırılmasıyla yaklaşık 1 hafta içinde kendiliğinden iyileşir (2). Dental plağın uzaklaştırılmadığı ve enflamasyonun kontrol altına alınamadığı durumlarda periodontitis gelişir. Ataçman ve kemik kaybı ile seyreden periodontitis mobilite, diş kaybı, çiğneme ve konuşma bozuklukları ile sonuçlanabilir (3).

Periodontal hastalıkların başlaması ve ilerlemesi konak immün ve enflamatuvar yanıtları tetikleyebilen periodontal patojenlerin varlığına bağlıdır (4). Hem periodontal patojenlerin kendileri hem de konakçının bu patojenlere karşı geliştirdiği immün ve enflamatuvar yanıtlar, periodontal hastalığın ilerlemesinde rol oynar. Her ne kadar periodontal hastalıkları başlatan bakteriyel enfeksiyon olsa da, patojene karşı gelişen immün ve enflamatuvar yanıtın periodontal doku yıkımındaki etkisi daha büyüktür (5,6).

En önemli immün ve enflamatuvar hücrelerden biri olan makrofajlar, periodontal patojene karşı gelişen konak cevabında önemli rol oynar (7–9). Enfeksiyon erken aşamasında makrofajlar sistemik dolaşımdan enfeksiyon bölgesine göç eder ve mikroorganizmalar ve ürünleri tarafından aktive edilir. Aktive makrofajlar periodontal patojenleri fagosite etmenin yanında, periodontal bağ dokusunu yıkıma uğratan proteazları (örneğin matriks metalloproteinaz [MMP]'ler ve kollajenaz), interlökin (IL)-1, IL-6, prostaglandin (PG)-E2 ve osteoklast olgunlaşmasını ve alveolar kemik rezorpsiyonunu destekleyen diğer sitokinleri salgırlar (10,11).

Makrofajlar fenotipik heterojenik hücrelerdir ve uyaranlara bağlı olarak 2 ana alt gruba ayrılırlar: klasik olarak aktive olan M1 makrofajlar ve alternatif olarak aktive olan M2 makrofajlar (12–14). M1 makrofajlar bakterilere ve virüslere karşı konak savunmasına aracılık eden proenflamatuvar etkili makrofajlardır. M2

makrofajlar ise enflamasyonun çözülmesine ve rejenerasyona yardımcı fonksiyonlar gösteren antienflamatuar makrofajlardır (15). Yardımcı T hücresi “*T-helper*” (Th)1 ve Th17 hücre cevapları ile ilişkili olan M1 makrofajlar IL-1 β , IL-6, TNF- α gibi proenflamatuar sitokinleri salgırlar ve yüksek düzeyde indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS)/NOS-2 üretirler (16,17). T-helper 2 hücre yanıtları ile ilişkili M2 makrofajlar ise IL-10 ve IL-1 reseptör antagonisti (IL-1RA) gibi antienflamatuar sitokinler ile transforme edici büyüme faktörü (TGF)- β ve epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi büyüme faktörleri salgırlar. Ayrıca proteolitik enzimler olan MMP-1,2,7,9 ile yüksek düzeyde arjinaz (Arg) üretirler.

Enfeksiyon sırasında önce patojenlerin ortamdan temizlenmesini hedefleyen proenflamatuar M1 makrofajlar oluşurken, akut enflamasyon geçtikten sonra enflamasyonun çözülmesini destekleyen antienflamatuar M2 makrofajlar baskın hale gelir. Makrofajlarda M1/M2 aktivasyonundaki dengesizlik ya da M1 fenotipinden M2’ye geçişin zamanında gerçekleşmemesi başarısız immün yanıt ve sonuçta periodontal hastalığın ilerlemesine neden olabilir (18,19). Yapılan çalışmalarda M1/M2 dengesinde M1 fenotipine doğru kaymanın oral enflamatuar hastalıkları şiddetlendirebileceği, M2 fenotipine doğru geçişin ise iyileşmeyi destekleyebileceği bildirilmiştir.

Literatürde M1/M2 dengesi ile NOS2 (M1 makrofaj metabolik belirteci)-Arg1 (M2 makrofaj metabolik belirteci) enzim dengesi ile ilişkilendirilmiştir (15,20). Nitrik oksit sentaz-2 enziminin arginini yıkması sonucu bakterilerin öldürülmesi ve enflamasyonun başlatılmasında görev alan nitrik oksit (NO) oluşur. Aynı substrat için yarışan Arg1 enziminin arjinini parçalaması sonucu oluşan poliaminler ve prolin ise doku proliferasyonu ve tamirinde rol oynar (20). Bu özelliklerinden dolayı M1 makrofajlar NOS2 enzim aktivitesi ile, M2 makrofajlar ise Arg1 enzim aktivitesi ile ilişkilendirilmiştir (20).

Konakçı tarafından periodontal patojene karşı geliştirilen enflamatuar yanıt proenflamatuar ve antienflamatuar sitokinler arasındaki denge tarafından belirlenir. Yapılan çalışmalarda (21) periodontitis oluşturulmuş farelerde periodonsiyum ve serumda hem M1 tip (IL-1 β) hem M2 tip (Arg1) sitokinlerin arttığı görülmekle birlikte, periodonsiyumda NOS2 (M1 makrofaj metabolik belirteci) / CD206 (M2

makrofaj hücre yüzeyi belirteci) oranının ve serumda IL-6 (M1 fenotip ilişkili sitokin)/IL-10 (M2 fenotip ilişkili sitokin) oranının arttığı rapor edilmiştir. Bu bulguların periodontitiste M1/M2 dengesinde M1'e doğru gerçekleşen fenotipik kaymayı işaret ettiği öne sürülmüştür. Bir başka hayvan çalışmasında da periodontitisli diş eti örneklerinde artmış M1/M2 oranı bulunmuştur (22). Klinik bir çalışmada da, M1/M2 oranının kronik periodontitisli hastalarda gingivitisli hastalara göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (23). Benzer şekilde, Zhou ve ark. (24) kronik periodontitisli bireylerin diş eti dokularında M1/M2 oranının ve proenflamatuar sitokinler tümör nekroz faktörü (TNF)- α , interferon (IFN)- γ , IL-6 ve IL-12 düzeylerinin daha yüksek olduğunu; sağlıklı grup ile gingivitis grubunda ise M1/M2 oranının benzer olduğunu belirtmişlerdir. Elde edilen bu bulgular doğrultusunda, periodontitiste M1/M2 dengesinde M1 yönüne doğru gerçekleşen fenotipik geçişin periodontal doku yıkımına aracılık eden önemli bir mekanizma olabileceği sonucuna varılmıştır (21).

Kronik enflamasyonda M1/M2 dengesinin rolüne dair artan kanıtlar araştırmacıların M1/M2 dengesinin düzenlenmesinde rol oynayan sinyal yolları ve reseptör-ligand etkileşimlerini incelemeye yönelmelerini sağlamıştır. Yapılan çalışmalarda epidermal büyüme faktörü (EGF) ailesinin bir üyesi olan Erb-b2 reseptör tirozin kinaz 4 (ErbB4, *v-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4 protein*)'ün spesifik ligandı neuregulin (Nrg)-4 ile etkileşiminin bu mekanizmalardan biri olduğu bildirilmiştir (25). Schumacher ve ark. (25), enflamatuar bağırsak hastalığında Nrg4 ve ErbB4'ün ekspresyonunun arttığını ve ErbB4-Nrg4 etkileşiminin M1 makrofajların mitokondriyal apoptozunu indüklediğini rapor etmişlerdir. Aktif enflamasyon aşamasında Nrg4 ekspresyonunun baskılanması ile M1 makrofajların ortamda kalmasının ve enflamasyonun devam etmesinin sağlandığı belirtilmiştir. Enflamasyonun iyileşme fazında ise Nrg4 ekspresyonunun artmasıyla M1 makrofaj apoptozunun indüklendiği ve ortamda iyileşmeyi destekleyici M2 fenotipinin baskın hale geldiği bildirilmiştir. Ekzojen Nrg4 uygulamasının deneysel kolit oluşturulan farelerde makrofaj sayılarını azaltarak enflamasyonunun çözülmesine katkı sağladığı rapor edilmiştir (25). Başka bir hayvan çalışmasında, Nrg4 gen transferi yapılan farelerde Nrg4'ün aşırı ekspresyonunun makrofaj belirteci monosit kemotaktik protein (MCP)-1 gen

ekspresyonunu inhibe ettiği, diğer yandan M2 makrofaj belirteç geni CD163 ekspresyonunu ise arttırdığı; sonuç olarak yüksek yağlı diyete bağlı gelişen kronik enflamasyonu azalttığı tespit edilmiştir (26). Bu bulgular doğrultusunda ErbB4-Nrg4 etkileşiminin proenflamatuar makrofajların apoptozunu tetikleyerek ve makrofaj belirteçlerinin gen ekspresyonunu inhibe ederek antienflamatuar etki gösterdiği öne sürülmüştür (25,26).

Tüm bu bilgiler ışığında, ErbB4-Nrg4 etkileşiminin kronik enflamatuar bir hastalık olan periodontitis patogeneğinde rol oynayabileceği varsayılmaktadır. Bu çalışmanın amacı; ErbB4-Nrg4 etkileşiminin, periodontal hastalıkta M1/M2 dengesindeki rolünü aydınlatmak; periodontal olarak sağlıklı, gingivitisli ve kronik periodontitisli bireylerin DOS ErbB4, Nrg4, IL-6 ve IL-10 seviyeleri ile serum ErbB4, Nrg4, NOS2 ve Arg1 düzeylerini incelemektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Periodontal Hastalıklar ve Durumlar

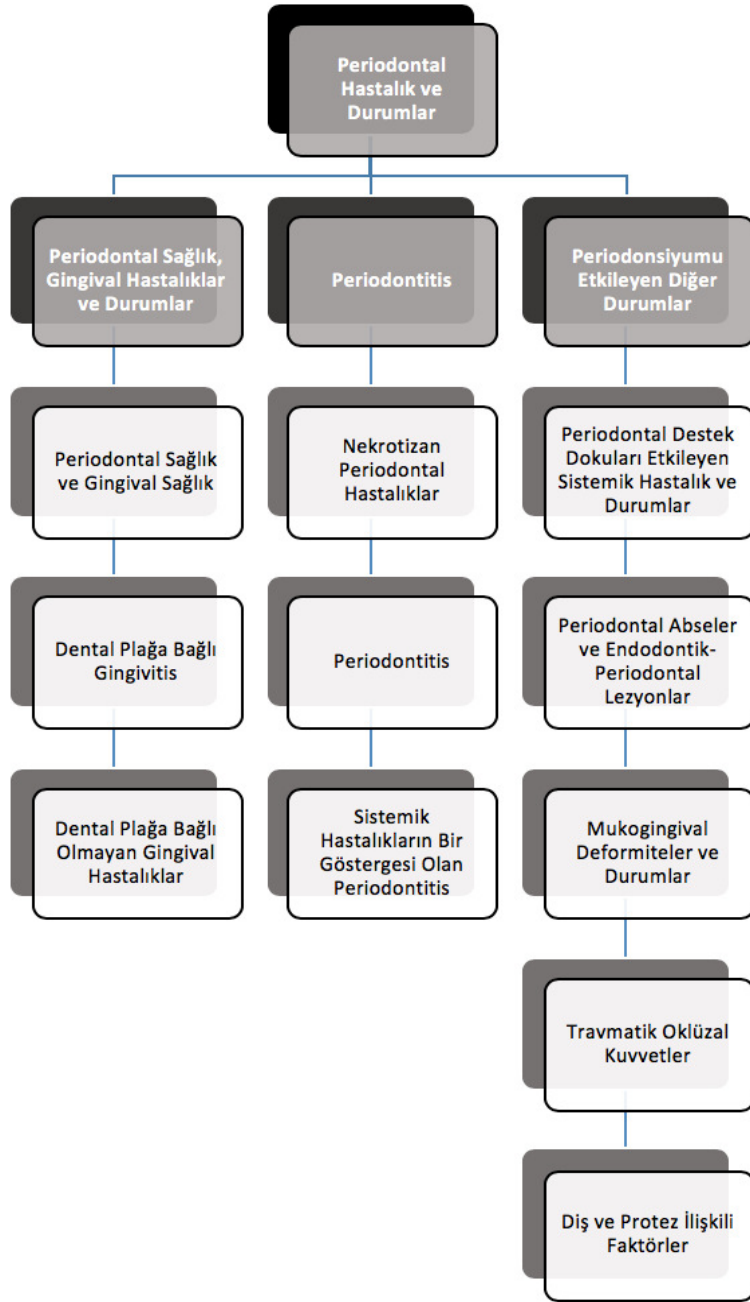
Periodontal sağlık, bir bireyin normal bir şekilde işlev görmesine izin veren, mevcut ya da geçirilmiş hastalıklara bağlı olarak zihinsel veya fiziksel sorunların gelişmediği ve enflamatuvar periodontal hastalığın bulunmadığı durum olarak tanımlanabilir. Diş eti enflamasyonunun klinik belirtilerinin görülmediği ve başarılı bir şekilde tedavi edilmiş gingivitis, periodontitis veya diğer periodontal durumlu kişiler “periodontal olarak sağlıklı” kabul edilir (27). Klinik diş eti sağlığı “*clinical gingival health*” konak yanıtı ile enflamatuvar infiltratın homeostazı ile ilişkilidir. “Bozulmamış periodonsiyumda klinik diş eti sağlığı” sondalamada kanama, kızarıklık, ödem, hasta semptomları, ataçman ve kemik kaybı olmamasıyla karakterizedir. “Azalmış periodonsiyumda klinik diş eti sağlığı” ise azalmış klinik ataçman ve kemik seviyeleri varlığında sondlamada kanama, eritem, ödem ve hasta semptomları olmaması şeklinde tanımlanır (28).

Gingival dokularda kolonize olan patojenik bakterilerin enflamatuvar cevabı tetiklemesi sonucu klinik diş eti sağlığı bozulabilir ve periodontal dokuları hasara uğratan periodontal hastalık gelişebilir (29). Periodontal hastalıklar, diş eti ve dişleri destekleyen dokuları etkileyen multifaktöriyel hastalıklardır (30). Bu hastalıklar genellikle plak birikimine bağlı gelişen diş eti enflamasyonu ile başlar. Gingivitis, mikrobiyal dental plak ve konağın savunma cevabı arasındaki dengenin konak aleyhinde bozulması ile ortaya çıkar (31). Diş etinin lokal enflamatuvar bir hastalığı olan gingivitiste enflamasyon sadece diş eti dokusuyla sınırlıdır ve periodonsiyumu oluşturan diğer dokularda hasar görülmez. Klinik olarak diş etinde renk değişikliği, form bozukluğu, ödem ve sondlamada kanama görülebilir (32). Gingivitis geri dönüşümü mümkün bir hastalıktır fakat tedavi edilmediği takdirde geri dönüşümsüz yıkımların görüldüğü periodontitise ilerleyebilir (33). Periodontitis, diş etinde enflamasyon ile birlikte periodontal doku yıkımı ve alveoler kemik kaybının görüldüğü kronik enflamatuvar hastalıktır (34). Periodontitisli hastalarda gingivitisin

klirik işaretlerine ek olarak dikey ve/veya yatay yönde kemik defektleri, periodontal cep oluşunu, dişlerde mobilite ve migrasyon görülebilir (35,36).

Günümüze kadar çeşitli periodontal hastalık sınıflamaları yapılmıştır (37–42). Son 19 yıldır kullanılmakta olan 1999 sınıflandırmasından (43) bu yana periodontal hastalık patofizyoloji hakkında elde edilen önemli bilgiler sınıflandırmanın değiştirilmesini gerekli kılmıştır. Sonuç olarak 2017 alıştayında evreleme “*staging*” ve derecelendirme “*grading*” sistemine dayanan çok boyutlu bir periodontal hastalık sınıflandırma erevesi geliştirilmiştir (28,44–46) (şekil 2.1, şekil 2.2, Tablo 2.1 ve Tablo 2.2). Bunun yanında, periodontal hastalık patofizyoloji hakkındaki güncel bilgiler doğrultusunda periodontitis kategorisi nekrotizan periodontitis, sistemik hastalıkların bir göstergesi olan periodontitis ve periodontitis olmak üzere üç gruba ayrılmıştır. Daha önce farklı hastalık formları olarak tanımlanan kronik ve agresif periodontitis ise yeni sınıflandırmada tek bir başlıkta “periodontitis” olarak gruplandırılmıştır (44,46).

Periodontitis evresinin belirlenmesi büyük ölçüde hastalığın şiddetine ve tedavisini zorlaştıran etmenlere bağlıdır. Derecelendirme ise hastalığın ilerleme hızının analiz edilebilmesi, ileriye dönük ilerleme riskinin belirlenebilmesi, yetersiz tedavi yanıtlarının ve hastalığın/tedavisinin hastanın genel sağlığını olumsuz yönde etkileme riskinin değerlendirilmesi gibi hastalığın biyolojik özellikleri hakkında ek bilgiler sağlar (45,46). Periodontitis evreleri (evre 1-4) klinik ataçman kaybı düzeyi, kemik kaybı miktarı ve yüzdesi, sondlama derinliği, açısal kemik defekti, furkasyon tutulumu, diş mobilitesi ve periodontitise bağlı gelişen diş kaybı varlığı gibi çeşitli değişkenlerin değerlendirilmesi ile belirlenir. Periodontitis düzeyleri (düzey A - düşük risk, düzey B - orta risk, düzey C - yüksek risk) ise periodontitisin ilerlemesi ve genel sağlık durumu ile sigara içme veya diyabetin metabolik kontrol düzeyi gibi diğer riskleri de kapsar (45,46). Bu nedenle derecelendirme, klinisyenin hastaya özel faktörleri de teşhise dahil etmesini sağlayarak vaka yönetimi daha kapsamlı hale getirir (44).



Şekil 2.1: Periodontal hastalık ve durumlar (44).

1. Periodontal sağlık A. Bozulmamış periodonsiyum ile birlikte görülen klinik sağlık B. Azalmış periodonsiyum ile birlikte görülen klinik gingival sağlık i. Stabil periodontitis hastası ii. Periodontitis olmayan hasta 2. Dental plağa bağlı gingivitis; bozulmamış periodonsiyum; periodontitis olmayan hastada azalmış periodonsiyum; başarılı bir şekilde tedavi edilmiş periodontitis hastasında azalmış periodonsiyum. A. Yalnızca biyofilm ile ilişkili B. Sistemik veya lokal risk faktörleri ile modifiye edilmiş i. Sistemik risk faktörleri a) Sigara b) Hiperglisemi c) Beslenme ile ilişkili faktörler d) Farmakolojik ajanlar e) Cinsiyet steroid hormonları Puberte Menstrual siklus Hamilelik Oral kontraseptifler f) Hematolojik durumlar ii. Lokal risk faktörleri (predispoze edici faktörler) a) Dental plak biyofilmin retansiyonunu arttıran faktörler (düzensiz restorasyon kenarları gibi) b) Ağız kuruluğu C. İlaç ile ilişkili diş eti büyümesi	3. Dental plağa bağlı olmayan gingival hastalıklar A. Genetik / gelişimsel bozukluklar i. Herediter gingival fibromatozis^a B. Spesifik enfeksiyonlar i. Bakteriyel kaynaklı a) Neisseria gonorrhoeae^a b) Treponema pallidum^a c) Mycobacterium tuberculosis^a d) Streptokokal gingivitis ii. Viral kaynaklı a) Coxsackie virüs (el-ayak-ve-ağız hastalığı)^a b) Herpes simplex I & II (primer veya rekürrent)^a c) Varicella zoster (chicken pox & shingles- V sinir)^a d) Molluscum contagiosum^a e) Human papilloma virüs (skuamoz hücreli papilloma; kondiloma aküminatum; verruka vulgaris; fokal epitelyal hiperplazi) iii. Fungal kaynaklı a) Kandidiyazis b) Diğer mikozlar, örneğin, histoplazmozis, aspergillozis C. İnflamatuvar ve immün durumlar i. Hipersensitivite reaksiyonları a) Kontakt alerji^a b) Plazma hücreli gingivitis^a c) Eritema multiforme^a ii. Deri ve müköz membranların otoimmün hastalıkları a) Pemfigus vulgaris^a b) Pemfigoid^a c) Liken planus^a d) Lupus eritematozus^a Sistemik lupus eritematozus Diskoid lupus eritematozus iii. Granülomatoz inflamatuvar lezyonlar (orofasiyal granülomatozlar) a) Crohn hastalığı^a b) Sarkoidoz^a	D. Reaktif süreçler i. Epulisler a) Fibröz epulis b) Kalsifiye fibroblastik granüloma c) Vasküler epulis (piyojenik granüloma) d) Periferik dev hücreli granüloma^a E. Neoplazmalar i. Premalign lezyonlar a) Lökoplaki b) Eritroplaki ii. Malign lezyonlar a) Skuamoz hücreli karsinom^a b) Lösemik hücre infiltrasyonu^a c) Lenfoma^a Hodgkin Non-Hodgkin F. Endokrin sistem, beslenme ile ilişkili ve metabolik hastalıklar i. Vitamin eksiklikleri^a a) Vitamin C eksikliği (skorbüt) G. Travmatik lezyonlar i. Fiziksel/mekanik travma a) Friksiyonel keratozis b) Mekanik travma ile ilişkili gingival ülserasyon d) Yapay yaralanma (kendi kendine zarar verme) ii. Kimyasal (toksik) yanık iii. Termal hasarlar a) Diş etinde yanık H. Gingival pigmentasyon i. Melanoplaki^a ii. İçicilerde melanozis iii. İlaç ile ilişkili pigmentasyon (antimalaryal ilaç, minosiklin) iv. Amalgam dövme ^a "a" ile işaretlenmiş durumlar, sistemik tutulumla ilişkilidir veya sistemik durumların oral belirtileridir; bu nedenle teşhis ve tedavide diğer sağlık uzmanları da yer alabilir.
--	---	--

Şekil 2.2: Gingival sağlık ve gingival hastalık/durumların sınıflandırması (28).

Tablo 2.1: Periodontitis evreleri (45).

Periodontitis evreleri		Evre I	Evre II	Evre III	Evre IV
Şiddet	En derin interdental KAK miktarı	1 – 2 mm	3 – 4 mm	≥ 5 mm	
	Radyografik kemik kaybı	Servikal üçlü (< %15)	Servikal üçlü (%15- %33)	Kökün orta veya apikal üçlüsüne uzanır	
	Diş kaybı	Periodontitise bağlı diş kaybı yok		Periodontitise bağlı kaybedilen diş sayısı ≤ 4	Periodontitise bağlı kaybedilen diş sayısı ≥ 5
Tedaviyi zorlaştıran faktörler	Lokal faktörler	• Maksimum SD ≤ 4 mm • Çoğunlukla horizontal kemik kaybı bulunur	• Maksimum SD ≤ 5 mm • Çoğunlukla horizontal kemik kaybı bulunur	Evre II ‘ye ilave olarak: • SD ≥ 6 mm • Vertikal kemik kaybı ≥ 3 mm • Sınıf II veya III furkasyon tutulumu • Orta düzeyde kret defekti	Evre III’e ilave olarak: Kompleks rehabilitasyon gerektiren durumlar: • Çiğneme bozuklukları • Sekonder oklüzal travma (mobilité derecesi ≥ 2) • Şiddetli kret defekti • Isırma kollapsı, drifting, flaring • Kalan diş sayısı 20’ den az (10 karşılıklı çift)
Bölge ve yayılım	Hastalığın evre tanımına açıklayıcı faktör olarak ilave edilir.	Her bir evre için <i>lokalize (etkilenen diş <%30), generalize, veya molar/kesici paterni</i> olarak tanımlanır.			
KAK: klinik ataçman kaybı, SD: sondlama derinliği.					

Tablo 2.2: Periodontitis düzeyleri (45).

Periodontitis düzeyi			Düzye A: Yavaş ilerleyen	Düzye B: Orta derecede ilerleyen	Düzye C: Hızlı ilerleyen
Birincil kriterler	İlerlemenin doğrudan kanıtı	Longitudinal veri (radyografik kemik kaybı veya KAK)	5 yılı aşan sürede kemik kaybı yok	5 yılı aşan sürede < 2 mm	5 yılı aşan sürede ≥ 2 mm
	İlerlemenin dolaylı kanıtı	Kemik kaybı yüzdesi /yaş	< 0.25	0.25 – 1.0	> 1.0
		Vaka fenotipi	Yoğun biyofilm birikimi ile birlikte düşük düzeyde periodontal yıkım	Biyofilm birikimi ile orantılı periodontal yıkım	Biyofilm miktarı ile orantısız olarak beklenenden fazla periodontal yıkım; hastalığın erken başlangıcı ve/veya hızlı ilerlemesini düşündüren spesifik klinik durumlar (örneğin, molar/kesici paterni; standart bakteriyel kontrol terapilerine beklenen yanıtın yetersiz oluşu)
Düzei değiştiren etkenler	Risk faktörleri	Sigara kullanımı	Yok	< 10 sigara / gün	≥ 10 sigara / gün
		Diyabet	Normal glisemik durum / diyabet teşhisi yok	Diyabetli hastada HbA1c < %7.0	Diyabetli hastada HbA1c ≥ %7.0
Periodontitisin sistemik etkisi	İnflamatuvar yük	Yüksek duyarlılık CRP (hsCRP)	<1 mg/L	1 – 3 mg/L	> 3 mg/L
Biyolojik belirteçler	KAK/ kemik kaybı göstergeleri	Tükürük, dişeti oluk sıvısı, serum	?	?	?
HbA1c, glikolize hemoglobin; hsCRP, yüksek duyarlılık CRP (high sensitivity C-reactive protein); KAK, klinik ataçman kaybı.					

2.2. Periodontal Hastalıkların Patogenezi

Plak birikimine yanıt olarak gingival dokularda meydana gelen değişimler çeşitli çalışmalarda incelenmiştir. Bu değişimler dizisi histopatolojik, radyografik ve morfolojik özelliklerine göre başlangıç, erken, yerleşmiş ve ilerlemiş evre olarak dört aşamada sınıflandırılmıştır. Başlangıç ve erken lezyon gingivitisin erken dönem evreleriyle, yerleşmiş lezyon kronik gingivitisle, ilerlemiş lezyon ise periodontitisle paralellik göstermekle birlikte, bu aşamalar arasında kesin sınırlar bulunmamaktadır (47).

Gingival dokuların 2-4 günlük mikrobiyal plak birikimine karşı verdiği cevap sonucu oluşan değişimler “başlangıç lezyonu” olarak isimlendirilir. Dokulardaki değişiklikler yalnızca histolojik olarak gözlemlenebildiğinden “subklinik gingivitis” olarak da adlandırılmaktadır (48). Yerleşik lökositler ve endotel hücreleri tarafından mikrobiyal plağa karşı oluşturulan bu yanıt klasik eksudatif vaskülit ile karakterizedir. Perivasküler kollajenin kaybını içermekle birlikte antijenik ve kemotaktik yapıların salınımını sağlar. Plak birikimi devam ettiği takdirde 4-10 gün içerisinde “erken lezyon” gelişir. Bu aşamada ise lenfosit ve diğer mononükleer hücrelerin yoğun infiltrasyonu, fibroblastların patolojik değişimleri ve devam eden bağ doku kaybı görülür (49). Bağlantı epitelinin alttaki bağ dokusuna doğru rete peg oluşturmaya başladığı gözlemlenmektedir (50). Devamında sulkus ve birleşim epitelinin geçirgenliği artar ve bu durum bakteriyel ürünlerin diş eti dokularına daha rahat geçmesine olanak tanır (51). Bu evrede klinik olarak sondlamada kanama ve diş eti oluğu sıvısı artışı görülebilir (52). Erken lezyonu 2-3 hafta içinde gelişen “yerleşmiş lezyon” takip eder. Bu evrede baskın olan hücreler ise plazma hücreleridir. Bağ dokusundaki yıkım sonucu birleşim epiteli apikale doğru yer değiştirmiş ve bağlantı epiteli cep epiteline dönüşmüştür. Rete pegler çevredeki bağ dokusu içine doğru gelişmeye devam eder (47). Klinikte diş eti kanamasına ek olarak renk ve kontur değişiklikleri görülebilir (36). Periodontal tedavi uygulanmadığı takdirde bu safha yıllarca stabil kalabilir veya ilerlemiş lezyona dönüşebilir (49). Periodontitise geçiş evresi olarak tanımlanan “ilerlemiş lezyon” esas olarak yerleşmiş lezyonla aynı hücresel yapılanmaya ve özelliklere sahiptir. Bu aşamada geri dönüşümsüz ataçman ve kemik kaybı histolojik ve klinik olarak gözlenir (36). Fibrozis ile birlikte doku yapısının bozulması bu safhanın önemli bir özelliğidir (49).

Periodontal patojenlere karşı gelişen enflamatuar yanıtın net etkisi, proenflamatuar ve antienflamatuar sitokinler arasındaki denge ile belirlenir. Sitokinler, enflamasyonun başlamasına ve ilerleyen aşamalarına dahil olan, immün yanıtın büyüklüğünü ve süresini düzenleyen düşük moleküler ağırlıklı proteinlerdir. Epitel hücreleri ve fibroblastlar gibi yerleşik hücreler, fagositler (nötrofiller ve makrofajlar) ve immün hücreler (lenfositler) tarafından üretilirler (53). İnflamatuar uyaranlara yanıt olarak periodontal dokulardaki hastalıklı alanlarda yoğun olarak bulunan nötrofiller, monositler/makrofajlar, dendritik hücreler, T ve B lenfositleri

tarafından TNF- α , IL1- β , IL-6, IL-7, IL-11 ve IL-17 gibi proenflamatuar sitokinler salgılanır (54). Bunun yanında IL-4, IL-10, IL-13, IL-16, IFN- β / γ , TGF- β , IL-1 IL-1RA, granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör “*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*” (GM-CSF) gibi sitokin yapısındaki moleküller ise antienflamatuar süreçleri düzenlemektedirler (55).

Proenflamatuar sitokinlerden biri olan IL-6 enflamasyon, konak savunması ve doku hasarıyla ilişkili olan çok yönlü bir sitokindir (56). İnterlökin-1 ve TNF- α gibi enflamatuar uyaranlara, endotoksin gibi bakteriyel ürünlere ve viral enfeksiyonlara karşı cevap olarak T ve B lenfositleri, monositler, makrofajlar, fibroblastlar, endotelial hücreler, epitelial hücreler, mezenşimal hücreler, osteoblastlar ve dentritik hücreler olmak üzere geniş bir hücre grubu tarafından üretilmektedir (56–60). İnterlökin-6, antikor (ve otoantikor) üretimi, T hücrelerinin aktivasyonu, B hücre farklılaşması, akut faz proteinlerinde artış, hematopoez, anjiyogenezin indüklenmesi, vasküler geçirgenlik ve osteoklast farklılaşması gibi bir takım biyolojik süreçlerde rol alır (61,62). Enflamasyonda IL-6 aktivitesi hem antienflamatuar (örneğin, nötrofil alımının ve proenflamatuar sitokin ekspresyonunun azaltarak düzenlenmesi “*downregulation*”) (63,64) hem de proenflamatuar (örneğin, karaciğer tarafından akut faz reaktanlarının salınımının indüklenmesi) (65) olarak işlev gördüğünden iki yönlü bir sitokin olarak da düşünülebilmektedir.

İnterlökin-6, periodonsiyumda enflamatuar yanıtta önemli rol oynar (66,67). Çalışmalar, periodontitisli hastalarda endotelial hücreler, fibroblastlar ve makrofajlarda IL-6 varlığını (68) ve diş eti mononükleer hücrelerinde yüksek düzeyde IL-6 mesajcı ribonükleik asit (mRNA) ekspresyonu olduğunu (69) göstermiştir. İlave olarak hayvan ve insan periodontal ligament fibroblastlarında periodontopatojenik bakteriler tarafından oluşturulan hasar varlığında IL-6 üretimi olduğu tespit edilmiştir (70–73). Artmış diş eti oluğu sıvısı (DOS) ve tükürük IL-6 düzeylerinin gingivitis varlığı ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (74,75). Ayrıca sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında periodontitisli bireylerde DOS, tükürük ve serum IL-6 düzeylerinin arttığı saptanmıştır (76–78). IL-6 ile kronik periodontitisin şiddeti arasındaki ilişkinin incelendiği bir çalışmada, periodontal cep derinliği arttıkça DOS IL-6 total miktarında da artış olduğu gösterilmiştir (79). Bununla birlikte, kronik periodontitis ve sağlıklı kişiler arasında tükürük IL-6 ve diğer sitokin

düzeylerinde hiçbir farkın saptanmadığını bildiren çelişkili bir rapor da mevcuttur (80). Periodontal tedavinin IL-6 düzeyleri üzerine etkisi incelendiğinde ise, periodontal tedaviye yanıt olarak erken dönem enflamatuar cevapla birlikte sistemik IL-6 seviyesinde artış olduğu (81,82), periodontal sağlık elde edildiğinde ise uzun dönemde IL-6 seviyesinde azalma olduğu rapor edilmiştir (83,84).

Çok yönlü sitokinlerden biri olan IL-10; makrofaj, monosit ve T hücrelerinin fonksiyon ve aktivasyonlarını engelleyen antienflamatuar bir sitokindir. B hücreleri, mast hücreleri, eozinofiller, makrofajlar ve dendritik hücreler ve çok sayıda T hücre alt kümesini de içeren birçok hücre tipi tarafından üretildiği bilinmektedir (85). İnterlökin-10 B hücreleri, doğal öldürücü “*natural killer*” (NK) hücreler, sitotoksik ve T-helper hücreleri, mast hücreleri, granülositler, dentritik hücreler, keratinositler ve endotelyal hücrelerin farklılaşmasını düzenlemektedir. İnterlökin-10 IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α gibi proenflamatuar sitokinleri ve jelatinaz, kollajenaz ve nitrik oksit sentezini inhibe eder (86,87). Lipopolisakkarit (LPS) ile uyarılmış polimorfonükleer lökosit (PMNL)’lerde IL-1RA üretimini artırır (88). Osteoklast oluşumunu inhibe ederek ve osteoblast farklılaşmasını arttırarak kemik metabolizması üzerinde etki gösterir (89). İnterlökin-10, makrofajlarda metalloproteinazların doku inhibitörlerinin sentezini arttırırken metalloproteinazların üretimini baskılamaktadır (90). Ayrıca osteoprotegerin (OPG) üretimini uyarır, bu da nükleer faktör- κ B reseptör aktivatörü “*receptor activator of nuclear factor- κ B ligand*” (RANKL)-RANK etkileşimini engelleyerek kemik rezorpsiyonunu önler. İnterlökin-10, alveoler kemik kaybında rol oynayanlar da dahil olmak üzere proenflamatuar sitokinleri düzenlediğinden, periodontal hastalıkta koruyucu bir sitokin olarak düşünülmektedir (91).

İnterlökin-10’un, özellikle monosit kaynaklı proenflamatuar sitokinlerin üretimini azaltılması ve koruyucu antikor üretiminin uyarılması ile periodontitiste rol oynadığı düşünülmektedir (92). Gemmell ve Seymour (93) klinik ataçman kaybı (KAK) > 5mm olan erişkin periodontitis lezyonlarından alınan gingival dokularda, KAK < 4 mm olan grup ile kıyaslandığında, daha düşük oranda IL-10 + CD8 hücreleri olduğunu rapor etmişlerdir. Bu sonuç, daha şiddetli periodontitisi olan hastaların daha az şiddetli grupla karşılaştırıldığında daha düşük IL-10 seviyelerine sahip olduklarını göstermektedir. Sağlıklı ve hastalıklı gingival dokularda IL-10 ekspresyonunu araştıran Yamazaki ve ark. (94), periodontitis grubunda (KAK = 4.8 $\pm$

1.5mm) kontrol grubundan (KAK= 2.0 ± 0.3 mm) daha düşük seviyede IL-10 ekspresyonu olduğunu bulmuşlardır. Yine başka bir çalışmada (95), minimal enflamasyonlu periodontal dokuların bulunduğu kontrol grubunda serum IL-10 düzeylerinin periodontitisli hastalardan daha yüksek olduğu saptanmıştır. Gemmell ve Seymour (93), yüksek düzeyde IL-10 + T hücrelerinin varlığının stabil bir lezyonu gösterebileceğini, düşük düzeyde IL-10 + T hücreleri varlığının ise ilerleyici bir lezyonu gösterebileceğini öne sürmüşlerdir. Bu veriler, antienflamatuar sitokin IL-10'un gingivitisin periodontitise ilerlemesini sınırlayan koruyucu rolünü düşündürmektedir.

2.3. Periodontitiste Makrofajların Rolü

Periodontal patojene yanıt olarak gelişen konak savunmasında ve periodontal doku hasarında makrofajların rolü oldukça önemlidir (7,96). Periodontitis patogeneğinde makrofajlar enflamasyonun başlaması, enflamasyonun çözülmesi ve doku tamiri, adaptif immünitinin aktivasyonu ve alveolar kemik rezorpsiyonu süreçlerinde görev alır (15,97).

Makrofajlar fenotipik heterojenik hücrelerdir ve mikroçevresel sinyallere yanıt olarak farklı makrofaj fenotipleri gelişebilir (15). Makrofajlar temel olarak iki alt gruba ayrılabilir. M1 makrofajlar proenflamatuar aktivasyona katılan, bakterilere ve virüslere karşı konak savunmasına aracılık eden, klasik olarak aktive olan makrofajlardır. M2 makrofajlar ise antienflamatuar ve iyileşmeye yardımcı fonksiyonlar gösteren, alternatif olarak aktive edilen makrofajlardır (15). İnterferon- γ tek başına veya LPS/ TNF- α ile birlikte M1 makrofaj aktivasyonunu indüklerken; IL-4 ve IL-13 M2 makrofaj aktivasyonunu uyarır (98). M1 makrofajlar, proenflamatuar sitokinler olan IL-1 β , IL-6, TNF- α ile CXCL9 ve CXCL10 kemokinlerini salgırlar ve yüksek düzeyde iNOS/NOS-2 üretirler (16,17). M1 fenotipi Th1 ve Th17 hücre cevapları ile ilişkilidir. M2 makrofajlar ise IL-10 ve IL-1RA gibi antienflamatuar sitokinler; TGF- β , vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi büyüme faktörleri salgırlar. Ayrıca proteolitik enzimler olan MMP-1,2,7,9 ile yüksek düzeyde çöpçü “scavenger”, mannoz (CD206) ve galaktoz reseptörleri ve arjinaz üretirler. M2

fenotipi yüksek düzeyde ürettikleri CCL17, CCL22, CCL24 kemokinleri yoluyla Th2 hücre yanıtları ve doku tamiri/rejenerasyonu süreçlerini düzenler (17,98–100).

Mikroorganizmalar ve ürünleri periodontal patojen kaynaklı enfeksiyonun erken aşamalarında doğal bağışıklık yanıtını tetikler (4). Doğal bağışıklık hücreleri aktive edilir ve makrofajları göç etmesi veya enfeksiyon alanında kalması yönünde etkileyen IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 gibi enflamatuvar sitokinler ve kemokinler salgılanır. Aktif makrofajların enflamasyon alanında birikmesi ve özelleşmesi makrofajların polarize olması olarak adlandırılır ve bunun sonucunda periodontal hastalığın klinik semptomları ortaya çıkar. Enfeksiyon sırasında önce proenflamatuvar M1 makrofajlar oluşurken, akut enflamasyon geçtikten sonra enflamasyonun çözülmesini destekleyen antienflamatuvar M2 makrofajlar baskın hale gelir. Makrofajlarda M1/M2 aktivasyonundaki dengesizlik ya da M1 fenotipinden M2'ye geçişin olması gerekenden erken gerçekleşmesi başarısız immün yanıtla sonuçlanabilir. Başarısız immün yanıt ise periodontal hastalığın ilerlemesine neden olabilmektedir (18,19). Yapılan çalışmalarda, makrofaj alt kümelerinin göreceli dengesizliğinin hastalığın seyrini etkileyebileceği, M1 fenotipine doğru kaymanın oral enflamatuvar bozuklukları şiddetlendirebilirken M2 fenotipindeki baskınlığın ise hastalığın hafiflemesini destekleyebileceği bildirilmiştir (21). Periodontal hastalık varlığında enfeksiyonun konak immün cevabı tarafından kontrol edilebildiği durumda gingivitis tablosunun ilerlemediği, kontrol edilemediği durumda ise M1 makrofajlar yoluyla kronik enflamatuvar yanıtın görüleceği belirtilmiştir (21).

M1/M2 oranındaki değişim, M1 ve M2 fenotipleri ile ilgili fonksiyonları düzenleyen iNOS/NOS2 ve Arg1 enzim dengesi ile ilişkilendirilmiştir (20). Arjininin NOS2 enzimi ile yıkımı sonucu ortaya çıkan nitrik oksit, enflamasyonun başlatılmasında ve bakterilerin yok edilmesinde yer alan önemli bir mediyatör olduğundan, NOS2 enzimi ile M1 makrofaj fonksiyonları paralellik göstermektedir. Arjininin diğer bir yıkım enzimi olan Arg1 ile parçalanması sonucu oluşan poliaminler ve prolin ise, doku proliferasyonu ve onarımında gerekli substratlar olduğundan Arg1 enzimi ile M2 makrofaj işlevleri birbiri ile ilişkilendirilmektedir (20). Nitrik oksit sentaz-2 ve Arg1 enzimlerin periodontal hastalık ile ilişkisini inceleyen çalışmalarda, kronik periodontitisli hastalarda diş eti NOS2 ve tükürük Arg1 seviyelerinin arttığı gösterilmiştir (101–103). Yu ve ark. (21), kronik

periodontitis oluşturulmuş farelerin diş etinde artmış NOS2 ve Arg1 düzeyleri tespit etmişlerdir. Gheren ve ark. (104) ise, kronik periodontitiste tükürük arjinaz aktivitesinin arttığını ve periodontal tedavi sonrası tükürük arjinaz aktivitesinin önemli ölçüde azaldığını bildirmişlerdir. Kronik periodontitisli hastaların diş etinde periodontal tedavi öncesi ve sonrası NOS ve arjinaz aktivitesinin değerlendirildiği klinik bir çalışmada ise, periodontal tedavi sonrası iNOS ekspresyonunun azaldığı, arjinaz seviyesinin ise arttığı tespit edilmiştir (105).

M1/M2 dengesinin ateroskleroz (106), obezite (15), fibrozis (107) ve sistemik skleroz (108) gibi birçok enflamatuar hastalığın patogeneğinde bir belirteç olabileceği düşünülmektedir. Son zamanlarda yine enflamatuar bir hastalık olan periodontitiste makrofajlardaki değişiklikler in vivo ve in vitro olarak araştırılmıştır. Makrofaj fenotiplerinin belirlenmesinde metabolik belirteçlerin (101–104,109), enflamatuar sitokinlerin (109–111) veya hücre yüzey belirteçlerinin (22,109) değerlendirildiği klinik çalışmalarda ve hayvan çalışmalarında, periodontitiste M1-benzeri makrofajların sayılarının arttığı gösterilmiştir. M2 makrofaj fenotipindeki değişiklikler ile ilgili ise tutarsız sonuçlar bulunmaktadır. Periodontitiste M2 fenotipinde artış olduğunu bildiren çalışmalar olduğu gibi (104,110), M2 fenotipinde azalma olduğunu gösteren çalışmalar (22,105) da mevcuttur. Yu ve ark.'nın yaptığı çalışmada (21) deneysel periodontitis oluşturulan farelerde kontrol grubu ile kıyaslandığında, hem periodonsiyum hem de serumda M1 ve M2 tipi sitokinlerin önemli ölçüde arttığı rapor edilmiştir. Periodontitiste periodonsiyumda NOS2/CD206 oranının ve serumda IL-6/IL-10 oranının artışının, periodontitiste M2'den M1'e doğru gerçekleşen fenotipik kaymayı işaret ettiği bildirilmiştir. Yine aynı çalışmada periodontitis oluşturulmuş farelerin periodonsiyumunda kontrol grubuna kıyasla artmış IL-1 β ve Arg1 mRNA seviyeleri tespit edilmiştir. Bir başka hayvan çalışmasında da deneysel periodontitis oluşturulmuş farelerin diş eti örneklerinde artmış M1/M2 oranı saptanmıştır (22).

Periodontitiste M1 ve M2 makrofaj aktivitelerinin artışı, daha önce periodontal hastalık ile ilişkisi kanıtlanmış olan bazı sitokin düzeylerinin arttığının görülmesiyle de desteklenmiştir (112). Yang ve ark. (23), kronik periodontitisli hastalarda gingivitisli hastalara göre daha yüksek bulunan M1/M2 oranının proenflamatuar sitokinler IL-1 β ve MMP-9 ile pozitif korelasyon gösterdiğini

bildirmiştir. Yine Zhou ve ark. (24) kronik periodontitisli bireylerin diş eti dokularında M1/M2 oranının ve proenflamatuar sitokinler TNF- α , IFN- γ , IL-6 ve IL-12 düzeylerinin artmış olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca sağlıklı grup ile gingivitis grubunda benzer M1/M2 oranı bulunduğunu, M2 makrofaj ile ilişkili sitokin IL-4 seviyesinin ise gingivitisli grupta sağlıklı gruptan anlamlı derecede daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Yine aynı çalışmada periodontal hastalığın şiddetini yansıtabilen önemli bir klinik parametre olan sondlama derinliğinin M1/M2 oranındaki ve M1 makrofaj ile ilişkili sitokinlerin seviyelerindeki artışla ilişkili olduğu bulunmuştur. Mevcut veriler değerlendirildiğinde, periodontitiste fenotipik geçişin M1 makrofajlarına doğru, gingivitiste ise M2 makrofajlarına doğru olduğu, bu nedenle bu fenotipik kaymanın periodontal doku yıkımına aracılık eden kritik bir mekanizma olabileceği öne sürülmüştür (21). Sonuç olarak M1/M2 oranı analizinin periodontal doku sağlık durumu hakkında yararlı bilgiler sağlayabileceği bildirilmiştir (23).

Bununla birlikte periodontitiste M1 fenotipine doğru bir geçiş olduğu sonucunu desteklemeyen çalışmalar da bulunmaktadır. Navarrete ve ark. (110) sağlıklı ve kronik periodontitisli diş etinde IFN- γ ve IL-6 (makrofajların klasik yol ile aktivasyonunun indirekt belirteçleri) ile IL-4 ve FXIII-A (makrofajların alternatif yol ile aktivasyonunun indirekt belirteçleri) seviyelerini karşılaştırmışlardır. Bu belirteçlerin sağlıklı ve hastalıklı tüm doku tiplerinde bulunmakla birlikte, IL-4 ve IL-6 konsantrasyonunun kronik periodontitisli bireylerde, FXIII-A konsantrasyonunun ise sağlıklı bireylerde daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Bu verilerden yola çıkarak hem sağlıklıta hem de kronik periodontitiste makrofajların her iki yol ile de aktive olabileceği sonucuna varmışlardır.

Kronik enflamasyonda M1/M2 dengesinin sağlanmasında çeşitli sinyal yolları ve reseptör-ligand etkileşimleri yer almaktadır. Yapılan çalışmalarda EGF ailesinin bir üyesi olan Erb-b2 reseptör tirozin kinaz 4 (ErbB4)'ün spesifik ligandı neuregulin-4 (Nrg4) ile etkileşiminin kronik enflamasyonda M1/M2 dengesinin düzenlenmesinde önemli rol oynadığı bildirilmiştir (25).

2.4. ErbB4 ve Nrg4

Reseptör tirozin kinaz (RTK) süper ailesi üyesi olan EGF ailesi, hücrelerin proliferasyonu ve canlılığının devam etmesi, anjiyogenez ve kanser metastazı gibi çeşitli hücresel süreçlerde rol oynar (113). Epidermal büyüme faktörü ailesi dört üyeden oluşur: ErbB1 (EGFR, HER1), ErbB2 (HER2, kemirgenlerde neu), ErbB3 (HER3) ve ErbB4 (HER4). Bu reseptörler bir hücre dışı ligand bağlayıcı alan “*ektodomain*”, bir transmembran alan “*domain*”, bir kısa jukstamembran kesit “*section*”, bir tirozin kinaz alanı ve bir tirozin içeren C-terminal kuyruğundan oluşan tek zincirli transmembran glikoproteinlerdir. Epitelyal, mezenşimal, kardiyak ve nöronal hücrelerde eksprese edilirler. Çözünebilir ligandın, reseptörün hücre dışı alanı ile bağlanması reseptörler arasında homo ve heterodimer oluşumunu teşvik eder. Reseptör dimerizasyonu, hücre içi tirozin kinaz alanının aktivasyonu ve C-terminal kuyruğunun fosforilasyonu için gereklidir (114).

Epidermal büyüme faktörü ailesi reseptörlerinden ErbB4, fonksiyonel hücre içi tirozin kinaz alanları aracılığıyla ligandları ve otofosforilat C-terminal kuyruklarını bağlama yeteneğine sahip tamamen fonksiyonel bir reseptör olarak düşünülebilir (115,116). Tüm ErbB reseptörleri çekirdekte lokalize olmasına rağmen ErbB4 reseptörü hücre dışı sinyallerin doğrudan çekirdeğe transdüksiyonunda “*transduction*” rol oynar (117). Çoklu proteolitik bölünmelere maruz kalmasının ardından sitoplazmik bölgenin hücre çekirdeğine translokasyonu “*translocation*” ile ortaya çıktığından ErbB4, diğer ErbB reseptörlerinden farklıdır (118).

Epidermal büyüme faktörü ailesinin birçok ligandı bulunmaktadır ve bu durum EGF yolağının sinyal çeşitliliğine katkıda bulunur. Bu ligandlardan Nrg1, Nrg2, heparin bağlayıcı EGF-benzeri büyüme faktörü (HB-EGF) (119), betaselülin “*betacellulin*” (120,121), epiregulin (122,123) ve epigen (124) ErbB4’e bağlanabilirken; Nrg3 (125), Nrg4 (126) ve tomoregulin (127) yalnızca ErbB4’e bağlanır.

Epidermal büyüme faktörü ailesi ligandlarından biri olan Nrg4, birçok organda eksprese edilmekle birlikte en yüksek seviyede kahverengi yağ dokusunda eksprese edilir (128,129). Neuregulin-4 ErbB4’e bağlanıp ErbB4’ü aktive eder ve fotolitik ayrılma sonrası EGF-benzeri alanı “*EGF-like domain*” serbest bırakarak

otokrin, parakrin veya endokrin sinyal olarak hareket eder (130). Neuregulin-4 apoptoz, enflamasyonun inhibisyonu ve nörit büyümesinin desteklenmesi gibi birçok biyolojik süreçte rol oynar (25,131–135). Ayrıca bir büyüme faktörü olarak Nrg4'ün meme kanseri, prostat kanseri, gastrointestinal malign lenfoma, mide kanseri ve oral lökoplaki ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (136–143).

2.4.1. ErbB4 ve Nrg4'ün Enflamatuvar Hastalılardaki Rolü

Kronik enflamasyondaki rolü ile ilgili artan güncel bilgiler araştırmacıları M1/M2 dengesinde rol oynayan sinyal mekanizmalarını incelemeye yöneltmiştir. Literatürde yeni bir adipokin olan Nrg4'ün obezite (144), insülin direnci (İD) (26), tip 2 diabetes mellitus (T2DM) (145), lipid metabolizması (128), enflamasyon (25) ve ateroskleroz (146) ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda bozulmuş glukoz toleransı ve T2DM'si olan kişilerin deri altı ve viseral yağ dokularında Nrg4 mRNA düzeylerinin önemli ölçüde daha düşük seviyede olduğu bulunmuştur (128). Obez yetişkinlerde Nrg4 ve metabolik sendrom (MetS) arasındaki ilişkiyi araştıran kesitsel bir çalışmada, obezitesi olan MetS hastalarında serum Nrg4 düzeylerinin azaldığı tespit edilmiştir (144). Yan ve ark.'larının yeni teşhis edilmiş T2DM'si bulunan bireylerde yaptıkları çalışmada, MetS'si olan T2DM hastalarında plazma Nrg4 seviyelerinin önemli derecede daha düşük olduğu bulunmuştur (130). Dahası, plazma Nrg4 seviyesi ile yüksek duyarlılık C-reaktif protein "*high sensitivity C-reactive protein*" (hsCRP) ve beyaz kan hücresi "*white blood cell*" (WBC) sayısı arasında negatif korelasyon olduğunu ve birbirleri ile bağımsız ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Bu verilerden yola çıkarak bu araştırmacılar plazma Nrg4 seviyeleri ile enflamasyon arasında bir ilişki olabileceği, Nrg4'ün yağ dokusundan proenflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu düzenleyebileceği ve proenflamatuvar sitokinlerin de adipositlerden Nrg4 salınımını baskılayabileceği sonucuna varmışlardır.

Bununla birlikte, serum Nrg4 düzeylerinin T2DM hastalarında sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede yüksek olduğunu, bel çevresi ve insülin direnci ile pozitif korelasyon gösterdiğini bildiren klinik çalışmalar da mevcuttur (145,147). Obezite, artmış T2DM riski ve düşük dereceli kronik enflamasyon gibi metabolik durumlarla ilişkili olduğu bilinen polikistik over sendromu (PKOS) ile Nrg4

arasındaki ilişki de yakın zamanda araştırılmıştır (148). Polikistik over sendromlu kadınlarda serum Nrg4 düzeylerinin artış gösterdiği ve hsCRP ile arasında pozitif yönlü korelasyon olduğu tespit edilmiştir. Araştırmacılar PKOS'ta yüksek serum Nrg4 düzeylerinin artmış insülin direnci ve düşük dereceli kronik enflamasyon ile ilişkili olabileceğini ve bu durumun düşük dereceli kronik enflamasyona karşı bir kompanzasyon mekanizması olarak ortaya çıkmış olabileceğini bildirmişlerdir.

ErbB4 ve Nrg4'ün enflamasyonda yer aldığına yönelik artan kanıtlar araştırmacıları genetik çalışmalara yönlendirmiştir (26,149–152). Neuregulin-4 gen transferinin yüksek yağlı diyetle bağlı obezite üzerindeki etkileri Ma ve ark. tarafından incelenmiştir (26). Çalışma sonuçlarına göre Nrg4'ün aşırı ekspresyonunun, makrofaj belirteçlerini kodlayan genlerin ve makrofaj kemokini MCP-1'in karaciğer ve adipoz dokulardaki ekspresyonunu azaltarak obezite ile ilişkili kronik enflamasyonu inhibe ettiği belirtilmiştir. Guo ve ark. (149) ise non-alkolik steatohepatit oluşturulmuş Nrg4 sentezleyemeyen farelerde karaciğerde TNF- α , IL1b, IL12b, NOS2, CCL2, CCL5 ve Adgre1 (F4/80) gibi hepatik enflamasyonda yer alan genlerin mRNA ekspresyonunun önemli ölçüde yükseldiğini tespit etmişlerdir. Neuregulin-4 transgenik farelerde ise F4 / 80 + makrofaj yoğunluğunun belirgin şekilde azaldığını ve Nrg4'ün karaciğer iltihabını azaltabildiğini bildirmişlerdir. Son zamanlardaki genom çapında ilişkilendirme çalışmaları, ErbB4 lokusundaki polimorfizmlerin obezite, diyabet ve diyabetik nefropatiyle ilişkili olduğunu (150–152), ErbB4-Nrg4 yolağının metabolik bozuklukların patogenezinde potansiyel bir katkısı olduğunu göstermektedir (149).

ErbB4-Nrg4 etkileşiminin enflamatuar hastalıklarla ilişkisini inceleyen diğer çalışmalarda, kolon epitelyal hücrelerinde enflamatuar sitokinler tarafından ErbB4 ekspresyonunun indüklendiği ve enflamatuar bağırsak hastalığı olan kişilerin kolon mukozasında ErbB4 seviyesinin yükseldiği bildirilmiştir (153). ErbB4'ün Nrg4 ile aktivasyonunun ise kolon epitelyal hücrelerinde enflamatuar sitokinler tarafından indüklenen apoptozu inhibe ederek hücre sağ kalımını “*survival*” desteklediği tespit edilmiştir (131,132). ErbB4 sinyalinin enflamasyondaki rolünü araştıran bir çalışmada, makrofajların klasik yoldan aktivasyonunun (M1 fenotipi oluşumunun) makrofajlarda ErbB4 ekspresyonunu indüklerken, makrofajların alternatif yoldan aktivasyonunun (M2 fenotipi oluşumunun) ErbB4 ekspresyonunu inhibe ettiği

bulunmuştur (25). Bununla birlikte ErbB4 spesifik ligandı Nrg4'ün M1 makrofajların mitokondriyal apoptozunu indüklediği gösterilmiştir (25). ErbB4-Nrg4 sinyalinin makrofaj apoptozundaki rolü ise şu şekilde açıklanmıştır: Makrofaj yüzeyinde eksprese olan ErbB4, ligandı Nrg4 ile uyarıldığında TNF- α dönüştürücü enzim (TACE)/ADAM17 tarafından ErbB4'ün hücre dışı alanı ayrılır. Daha sonra γ -sekretaz enzimi aracılığıyla ErbB4'ün hücre içi bölünmesi gerçekleşir ve ErbB4 hücre içi alanı “*intracellular domain*” (4ICD) ortaya çıkar. Proapoptotik özellik taşıyan 4ICD, hücresel davranışı düzenlemek üzere sitoplazmaya, çekirdeğe veya mitokondriye lokalize olabilir. 4ICD'nin mitokondriyal birikimi *BCL-2 antagonist/killer* (BAK) aktivasyonuna ve daha sonra geçirgenliği artmış mitokondriden sitokrom-c sızıntısına neden olur. Hücre içinde sitokrom-c birikimi sonucu apoptotik hücre ölümü gerçekleşir (25,154). Schumacher ve ark. (25) deneysel kolit oluşturulan farelerde aktif enflamasyon aşamasında M1 makrofajın görevini yerine getirmesini sağlayacak şekilde Nrg4 ekspresyonunun baskılandığını, enflamasyonun çözülme aşamasında ise görevini tamamlayan M1 makrofajların ortamdaki temizlenmesini sağlamak üzere Nrg4 ekspresyonunun artış gösterdiğini bildirmişlerdir. İlave olarak ekzojen Nrg4 uygulanmasının makrofaj sayılarını ve TNF- α , IFN- γ ve IL-6 seviyelerini azalttığını; böylece enflamasyonunun çözünmesine katkı sağladığı bildirilmiştir. Ek olarak, McElroy ve ark. tarafından yapılan çalışmada nekrotizan enterokolit oluşturulmuş fare ve sıçanlarda Nrg4'ün nekrotizan enterokolit şiddetini azaltabildiği rapor edilmiştir (132). Bu bulgular birlikte ele alındığında ErbB4-Nrg4 etkileşiminin, proenflamatuar makrofaj apoptozunu uyararak ve makrofaj belirteçlerinin gen ekspresyonunu azaltarak antienflamatuar bir role sahip olabileceğine işaret etmektedir (25,26).

Tüm bu veriler değerlendirildiğinde, kronik enflamatuar hastalıklar olan T2DM ve obezitede serum/plazma Nrg4 seviyelerinde değişiklik olduğu (144,147) ve ErbB4-Nrg4 etkileşiminin kronik enflamasyonda önemli rol oynadığı (25,26) saptanmıştır. ErbB4-Nrg4 etkileşiminin yine kronik enflamatuar bir hastalık olan periodontitis patogeneğinde de rol oynayabileceği hipotezinden yola çıkılarak bu çalışmada, periodontal olarak sağlıklı, gingivitisli ve kronik periodontitisli bireylerin DOS ErbB4, Nrg4, IL-6 ve IL-10 seviyeleri ile serum ErbB4, Nrg4, NOS2 ve Arg1 düzeylerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Kliniği'ne Nisan 2018–Ocak 2019 tarihleri arasında başvuran periodontal olarak sağlıklı, plağa bağlı gingivitisli, orta şiddetli (Evre II, düzey B) ve şiddetli periodontitisli (Evre III, düzey B) bireyler üzerinde yürütüldü. Araştırma için Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan onay alındı (Tarih: 28.12.2017, Karar Sayısı: 2017/113) (Bkz.EK 1).

Periodontal dokuları etkileyebilecek sistemik hastalık ve/veya durumları olan (kardiyovasküler hastalıklar, immün sistem hastalıkları, romatoid artrit, kanser, diabetes mellitus gibi), bulaşıcı bir hastalığı olan (Edinilmiş Bağışıklık Eksikliği Sendromu “*Acquired Immune Deficiency Syndrome*” [AIDS], Hepatit B vb), periodontal dokular üzerinde etki gösterebilecek herhangi bir ilaç kullanan, vücut kitle indeksi (VKİ) 30 kg/m² den fazla olan, serum C-reaktif protein (CRP) değeri 3 mg/L'den fazla olan, üçüncü azı dişleri hariç 20'den az doğal dişi bulunan, periodontitise bağlı olarak 5 veya daha fazla diş kaybı olan, son üç ay içerisinde antibiyotik veya antienflamatuar ilaç kullanmış olan, son altı ay içerisinde periodontal tedavi görmüş olan, sigara içen ve 18 yaşından küçük bireyler ile hamile veya laktasyon dönemindeki kadın bireyler çalışmaya dahil edilmedi.

Hastaların muayenesinde ve periodontal durumun teşhisinde klinik periodontal parametreler, ısırma “*bitewing*” ve panoramik radyografilerden yararlanılarak üçüncü azı dişleri hariç tüm dişler değerlendirildi.

Çalışmaya dahil edilen tüm bireylere herhangi bir işlem yapılmadan önce mevcut periodontal durumları, ağız hijyenleri, uygulanacak periodontal tedaviler ve alınacak örnekler konusunda bilgi verildi. Araştırmanın amacı ve içeriği tüm bireylere anlatıldı ve bireylerin yazılı onamları alındı (Bkz.EK 2).

3.1. Çalışma Grupları

Çalışma için periodontoloji kliniğine başvuran toplam 192 hasta muayene edildi. Bireylerin 74'ü dahil edilme kriterlerine uygun bulunmadı. On sekiz kişi ise çalışmaya katılmayı kabul etmedi. Toplam 100 birey ile çalışmaya başlandı. Çalışma

sırasında 20 birey tedavi seanslarına veya 1. ay kontrollerine gelmediğinden çalışmadan çıkarıldı. Çalışma toplam 80 birey ile tamamlandı. Bireyler aşağıda gösterildiği şekilde dört gruba ayrıldı:

I. Sağlıklı grup (S) (n=20): İnterproksimal ataçman kaybı görülmeyen, sondlama derinliği (SD)≤3 mm olan ve tüm ağız sondlamada kanama görülen alan yüzdesi <%10 olan bireyler

II. Gingivitis grubu (G) (n=20): İnterproksimal ataçman kaybı görülmeyen, sondlama derinliği (SD)≤3 mm ve tüm ağız sondlamada kanama görülen alan yüzdesi ≥ %10 olan bireyler

III. Orta şiddetli periodontitis (Evre II, düzey B) grubu (P1) (n=20): Her iki çenede en az 4 dişte 3<SD≤5 mm, klinik ataçman kaybı 3≤(KAK)<5 mm, tüm ağız sondlamada kanama görülen alan yüzdesi ≥ %10 olan ve periodontitise bağlı diş kaybı olmayan bireyler

IV. Şiddetli periodontitis (Evre III, düzey B) grubu (P2) (n=20): Her iki çenede en az 4 dişte SD>5 mm; KAK≥5 mm, tüm ağız sondlamada kanama görülen alan yüzdesi ≥ %10 ve periodontitise bağlı diş kaybı ≤4 olan bireyler

Çalışma planı Şekil 3.1’de özetlendiği şekildedir.

3.2. Klinik Periodontal Değerlendirme

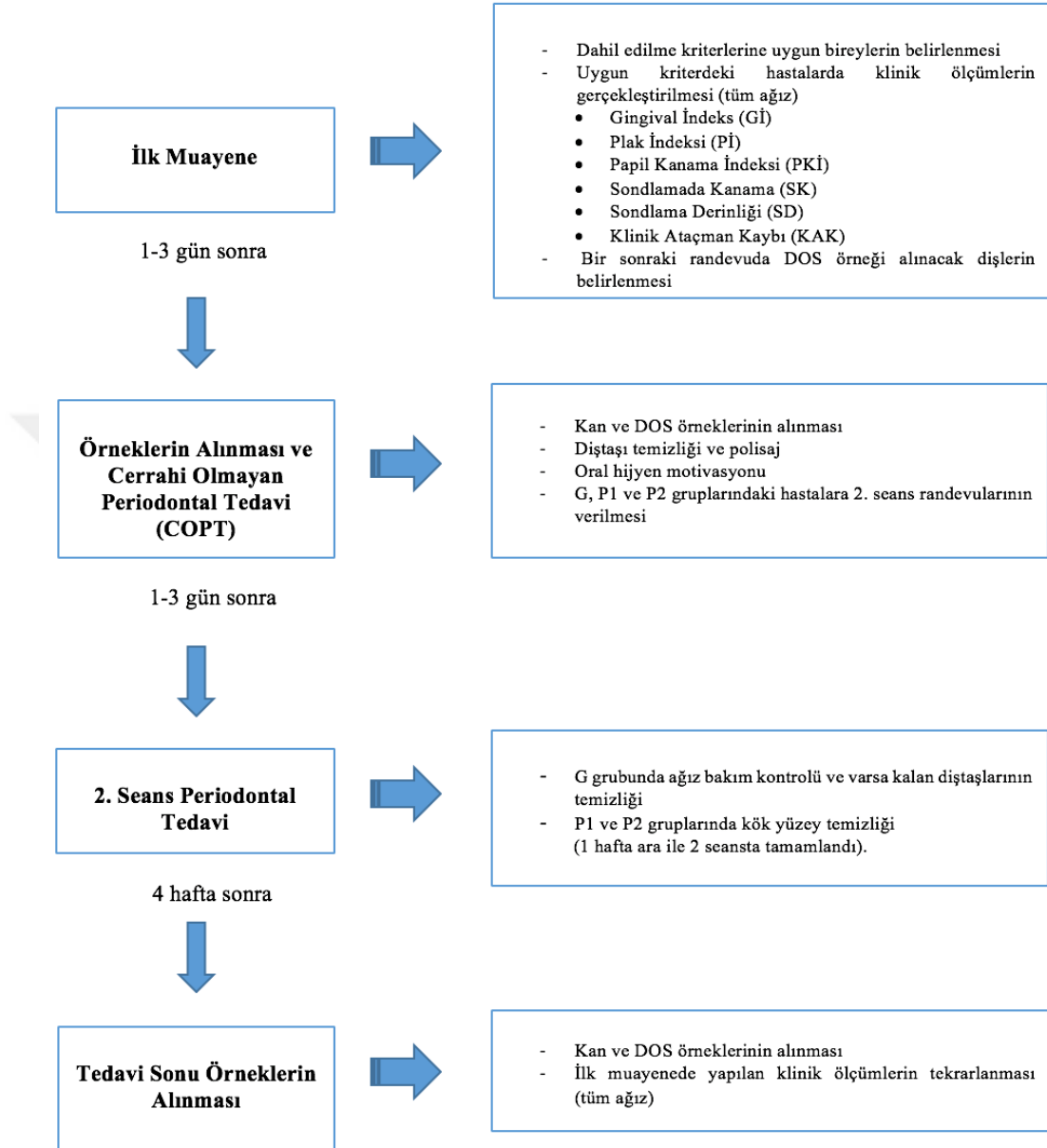
Klinik olarak gingival indeks (Gİ) (Löe & Silness, 1963) (155), plak indeksi (Pİ) (Löe & Silness, 1967) (156), papil kanama indeksi (PKİ) (Saxer & Mühleman, 1975) (157), sondlamada kanama (SK), sondlama derinliği (SD) ve klinik ataçman kaybı (KAK) ölçümleri yapıldı. Tüm klinik ölçümler çalışma öncesinde kalibre olmuş tek bir klinisyen (BM) tarafından, UNC-15 periodontal sond¹ ile yapıldı.

Araştırmacı kalibrasyonu

Araştırmacı kalibrasyonu için çalışmada yer almayan 5 periodontitisli bireyde 24 saat arayla periodontal klinik ölçümler gerçekleştirildi. Sondlama derinliği ve KAK için sınıf içi korelasyon katsayıları “*intraclass correlation coefficient*” (sırasıyla 0.833-0.994, 0.918-0.964) ile Pİ, PKİ ve Gİ için Cohen’s kappa değerleri

¹ Hu Friedy®, Chicago, Illinois, USA

(sırasıyla $\kappa=0.750-1.000$, $\kappa=0.688-1.000$, $\kappa=0.737-1.000$) kabul edilebilir düzeydeydi.



Şekil 3.1: Çalışma planı

3.2.1. Gingival indeks (Gİ)

Bütün dişlerin 4 bölgesindeki (bukkal, lingual/palatal, mezial ve distal) enflamasyon değerleri ölçüldü ve her bir dişe ait Gİ ortalaması belirlendi. Tüm değerlerin toplamı toplam diş sayısına bölünerek bireylere ait Gİ ortalaması hesaplandı. Değerlendirme aşağıda belirtildiği şekilde yapıldı:

0: Sağlıklı diş eti

1: Hafif iltihap, renkte hafif değişiklik, hafif ödem, sond ile temasta kanama olmayan diş eti

2: Orta derecede iltihap, kırmızılık, ödem ve sond ile temasta kanama görülen diş eti

3: Şiddetli iltihap, bariz kırmızılık ve ödem, ülser ve spontan kanama görülen diş eti (155)

3.2.2. Plak indeksi (Pİ)

Pİ ölçümleri, her bir dişin 4 bölgesinden (bukkal, lingual/palatal, mezial ve distal) diş eti oluşuna yerleştirilen bir periodontal sond ucunun diş yüzeyine sürttürülüp çekilmesi ile elde edildi. Elde edilen değerlerin ortalaması alınarak dişlere ait Pİ değeri belirlendi. Daha sonra elde edilen veriler toplam diş sayısına bölünerek her bir birey için ortalama Pİ hesaplandı.

Ölçümler aşağıdaki kriterlere göre yapıldı:

0: Diş eti bölgesinde hiçbir bakteri plağı görülmez.

1: Göz ile diş yüzeyinde bakteri plağı görülmemekte fakat sondlamadan sonra sond ucunda bakteri plağı izlenmektedir.

2: Diş eti bölgesi ince ve orta düzeyde bakteri plağı ile kaplı ve bu birikinti göz ile seçilebilmektedir.

3: Fazla miktarda yumuşak birikinti vardır, bunun kalınlığı diş eti oluşunu tamamen doldurmuştur ve interdental bölge yumuşak debris ile doludur (156).

3.2.3. Papil kanama indeksi (PKİ)

Tüm dişlerin 4 bölgesinden (distobukkal, distopalatinal, meziobukkal, meziolingual) hafif sondlama ile interdental papilin kanaması değerlendirildi. Elde edilen değerlerin ortalaması alınarak diş ağıt PKİ belirlendi ve bireylere ait PKİ ortalamasının hesaplanması için tüm değerlerin toplamı toplam diş sayısına bölündü. Değerlendirme aşağıda özetlendiğı şekilde yapıldı:

- 0: Kanama yoktur.
- 1: Sadece bir noktada kanama vardır.
- 2: Küçük bir alanda çeşitli izole kanama noktaları vardır.
- 3: İnterdental üçgen kan ile doludur.
- 4: Marjinal gingivaya doğru yayılan bolca kanama vardır (157).

3.2.4. Sondlamada kanama (SK)

Her dişin 6 bölgesinde (bukkal ve palatal yüzeylerin mezial, orta ve distal noktalarında) diş eti oluğu hafifçe sondlandıktan sonra ilgili alanda 10 saniye içerisinde kanama oluyorsa “+”, kanama olmuyorsa “-“ olarak kaydedildi. Kanama görülen alanların toplamının değerlendirilen toplam bölge sayısına bölünmesi ile elde edilen sayı 100 ile çarpılarak kanama görülen alanların yüzdesi hesaplandı.

3.2.5. Sondlama derinliği (SD)

SD ölçümleri, her dişin 6 bölgesinde (bukkal ve palatal yüzeylerin mezial, orta ve distal noktalarından), hafif sondlama ile hissedilen cep tabanı ve serbest diş eti kenarı arası mesafe ölçülerek hesaplandı. Ölçüm esnasında sondun dişin uzun aksına paralel olmasına ve aşırı kuvvet uygulanmamasına dikkat edildi. Daha sonra tüm ölçümlerin aritmetik ortalaması alınarak her bir dişe ve hastaya ait değerler belirlendi.

3.2.6. Klinik ataçman kaybı (KAK)

KAK ölçümleri, her dişin 6 bölgesinden (bukkal ve palatal yüzeylerin mezial, orta ve distal noktalarından) gerçekleştirildi. Tüm dişlerin mine-sement sınırı ile sondlanabilir sulkus/cep tabanı arasındaki mesafe periodontal sond kullanılarak ölçüldü. Ölçülen değerlerin ortalamaları alınarak her bir hastaya ait KAK düzeyleri belirlendi.

3.3. Biyokimyasal Değerlendirme

3.3.1. Diş eti oluğu sıvısı (DOS) örneklerinin elde edilmesi

Her bir bireyde ilk muayene sırasında belirlenen alt çenede iki ve üst çenede iki olmak üzere dört adet çok köklü diştten DOS toplandı. Örneklemeler tüm klinik periodontal ölçümler kaydedildikten 24-72 saat sonra yapıldı. Örneklemeye için saat 10.00-13.00 saatleri arası tercih edildi. Her bir çalışma grubunda örneklemeye yapılacak bölgelerin seçiminde göz önüne alınan kriterler aşağıda belirtildi:

S: $GI < 1$, $SD \leq 3$, $PKI = 0$ ve $KAK = 0$

G: $GI \geq 2$, $SD \leq 3$, $PKI > 2$ ve $KAK = 0$

P1: en şiddetli yıkımın görüldüğü $3 < SD \leq 5$, $GI \geq 2$, $PKI > 2$ ve $3 \leq KAK < 5$ mm

P2: en şiddetli yıkımın görüldüğü $SD \geq 5$, $GI \geq 2$, $PKI > 2$ ve $KAK \geq 5$ mm

Periotron cihazının kalibrasyonu

Diş eti oluk sıvısı hacimlerinin ölçülmesi için kullanılan Periotron 8010² cihazı çalışma öncesinde üretici firmanın talimatları doğrultusunda kalibre edildi. Cihaz olası buharlaşma miktarını en aza indirmek için örneklemelerin yapıldığı ortamda konumlandırıldı. Kalibrasyon işlemi 5 µl'lik Hamilton şırıngası ile distile su kullanılarak gerçekleştirildi. Buna göre 0.25, 0.50, 0.75, 1.00 ve 1.25 µl hacmindeki sıvılar ayrı ayrı kağıt şeritlere³ emdirildi ve cihazda okutuldu. Bu işlem her bir µl değeri için 3 kere tekrar edildi ve ortalamaları alındı. Elde edilen ortalama değerler cihazın bilgisayar programına kaydedilerek cihaz kalibre edildi.

Her bir hastada DOS örneklerinin alınmasına başlamadan önce üretici firmanın tavsiyesi doğrultusunda periotron elektrotları alkol emdirilmiş steril gazlı bez ile nazikçe silindi. Kuru bir kağıt şerit cihaza yerleştirildi, "0" skoru kontrol edildi ve cihaz ölçüme hazır hale getirildi. Örneklerin toplanmasından hemen önce supragingival plak, diş eti kenarı ile temas etmeden steril kretuvarlarla⁴ uzaklaştırıldı. Tükürük ile kontaminasyonu önlemek için pamuk rulolar kullanılarak bölge izole

² Periotron 8010, Oraflow Inc., New York, USA

³ OraFlow Inc., Plainview, NY, USA

⁴ Hu Friedy®, Chicago, Illinois, USA

edildi ve ilgili alan hava spreyi ile yavaşça kurutuldu. Daha sonra kağıt şeritler sulkus içine 1 mm kadar yerleştirildi ve DOS'un toplanması için sulkusta 30 saniye beklendi (158). Kan ve/veya tükürük ile kontamine olan kağıt şeritler çalışmaya dahil edilmedi. Kağıt şeritteki sıvı miktarı önceden kalibre edilmiş Periotron cihazı ile ölçüldü. Cihazda okunan periotron skorları bilgisayar programı kullanılarak mikrolitre (µl) birimine çevrilip kaydedildi. Bu işlemle hastadan elde edilen dört kağıt şerit aynı eppendorf tüp içerisine konuldu, kapağın etrafı parafin bant ile sarılarak numaralandırıldı. Örnekler analiz edileceği güne kadar önce -40 °C'de daha sonra -80 °C'de saklandı.

3.3.2. Serum örneklerinin elde edilmesi

Çalışmaya dahil edilen tüm bireylerden tüm ağız klinik ölçümlerin yapıldığı ilk seanstan 24-72 saat sonra antekübital damardan 6 ml hacminde periferik kan numuneleri alındı ve jel içeren tüplerde⁵ toplandı. Örnekler serum bileşeni ayırmak için santrifüj cihazında⁶ 20 dakika süreyle 1,500 rpm'de santrifüj edildi. Elde edilen serum 1,5 ml'lik eppendorf tüp içerisine konulduktan sonra kapağı parafin bant ile sarıldı ve numaralandırıldı. Serum örnekleri analiz edilinceye kadar önce - 40 °C sonra - 80 °C'de saklandı.

3.4. Cerrahi Olmayan Periodontal Tedavi

Cerrahi olmayan periodontal tedavi (COPT) tüm hastalara aynı hekim tarafından (BM) uygulandı. Başlangıç serum ve DOS örneklerinin alınmasının ardından G, P1 ve P2 grubundaki hastalarda kretuvar ve ultrasonik cihazlar⁷ kullanılarak supragingival diştaşı temizliği gerçekleştirildi. Devamında polisaj lastiği ve polisaj patı⁸ kullanılarak polisaj yapıldı. Gerekli ağız bakım talimatları anlatılarak ikinci seans için randevu verildi. Sağlıklı gruptaki bireylere ise sadece ağız bakım eğitimi verildi. İkinci seansta (ilk seanstan 1-3 gün sonra) G grubundaki bireylerde varsa kalan diştaşları temizlendi ve ağız bakım kontrolü yapıldı. P1 ve P2 grubundaki hastalara ise lokal anestezi altında/olmadan bölgeye spesifik manuel

⁵ BD Vacutainer; Becton, Dickinson, and Company; Plymouth, U.K.

⁶ IntraSpin, INTRA-LOCK INTERNATIONAL, USA

⁷ EMS, Swiss Dental Academy, Switzerland

⁸ TOPEX[®], Sultan Healthcare, PA, USA

küretler ⁹ ile kök yüzey temizliği (KYT) işlemi gerçekleştirildi. Kök yüzeyi temizliği, her seansta iki yarım çeneye uygulanmak üzere, bir hafta ara ile toplam iki seansta tamamlandı.

Cerrahi olmayan periodontal tedavi kapsamında dişlerde oklüzal travma yaratabilecek erken temas noktaları ortadan kaldırıldı, plak birikimini kolaylaştırıp ağız hijyen uygulamalarını zorlaştıran hatalı restorasyonların düzeltilmesi için hasta ilgili bölümlere yönlendirildi. Cerrahi olmayan periodontal tedaviye ek olarak herhangi bir antimikrobiyal ajan, destekleyici ilaç veya tedavi uygulanmadı.

3.5. Laboratuvar İşlemleri

3.5.1. DOS ErbB4, Nrg4, IL-6 ve IL-10 düzeylerinin belirlenmesi

Diş eti oluk sıvısı örneklerinin ErbB4, Nrg4, IL-6 ve IL-10 düzeylerinin ölçümleri Selçuk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Araştırma Merkezi'nde enzim bağlı immunosorbent analiz “*Enzyme Linked-ImmunoSorbent Assay*” (ELISA) ile ticari ELISA kitleri (ErbB4¹⁰, Nrg4¹¹, IL-6¹² ve IL-10¹³) kullanılarak gerçekleştirildi.

DOS ErbB4 ve Nrg4 düzeyinin belirlenmesi

Diş eti oluk sıvısı örneklerinin biyokimyasal analizi ticari kitlerde belirtilen protokole uygun olarak hazırlandı. Öncelikle donmuş haldeki DOS örnekleri ve kit içerikleri oda sıcaklığında bekletilerek incelemeye hazır hale getirildi. Çözünen örneklerle 500 µl “*phosphate buffered saline*” (PBS) eklendikten sonra 1000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. Standartlar üreticinin direktifleri doğrultusunda hazırlandı. Plak üzerindeki kuyucuklara 100 µl standart ve 100 µl örnekleri ilave edildi ve üzerleri yapışkan bant ile kapatılarak 37 °C’de 2 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra yıkama yapılmadan yalnızca kuyucuklardaki sıvı uzaklaştırıldı. Daha sonra 100 µl “*biotin-antibody (1x)*” kuyucuklara eklendi ve üzerleri yapışkan bant ile örtülerek 37 °C’de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi

⁹ Hu Friedy®, Chicago, Illinois, USA

¹⁰ CSB-EL007766HU, Cusabio, Wuhan, China

¹¹ CSB-EL016080HU, Cusabio, Wuhan, China

¹² HEA079HU, Cloud-Clone, USA

¹³ SEA056HU, Cloud-Clone, USA

tamamlanan plaklar yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı. Yıkama işleminden sonra 100 µl HRP-avidin (1x) solüsyonu kuyucuklara eklendi ve üzeri kapatılan plak 37 °C’de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Bekleme süresinin sonunda yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkama yapıldı. Yıkama sonrası kuyucuklara 90 µl TMB substrat eklendi ve kuyucuklardaki solüsyonun mavi renge dönüştüğü gözlemlendi. Plak karanlıkta ve 37 °C’de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra her bir kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklendi ve kuyucuklardaki solüsyonun sarı renge dönüştüğü izlendi. Daha sonra plak ELISA optik okuyucu cihazında¹⁴ 450 nm dalga boyunda okutuldu. Standart değerlerin optik okuması sonrası elde edilen verilere göre standart eğri oluşturuldu. Okunan DOS ErbB4 (ng/ml) ve Nrg4 değerleri (pg/ml) sulandırma miktarı (0.5 ml) ile çarpılarak ErbB4 (ng) ve Nrg4 total miktarı (pg) belirlendi. Elde edilen total miktarlar dörde bölünerek 30 sn’de toplanan ErbB4 (ng/30 sn) ve Nrg4 miktarı (pg/30 sn) belirlendi. Birim hacimdeki konsantrasyonları hesaplanırken okunan ErbB4 (ng/ml) ve Nrg4 değerleri (pg/ml) sulandırma miktarı ile çarpıldı ve DOS hacmine (µl) bölündü.

DOS IL-6 ve IL-10 seviyesinin belirlenmesi

Çözdürülen DOS örneklerine 500 µl PBS eklendikten sonra örnekler 1000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. Standartlar üreticinin direktifleri doğrultusunda hazırlandı. Plak üzerindeki kuyucuklara 100 µl standart ve 100 µl örnek eklendi. Plak üzeri yapışkan bant ile kapatılarak 37 °C’de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan süresi sonunda yıkama yapılmadan yalnızca kuyucuklardaki sıvı uzaklaştırıldı. Daha sonra kuyucuklara 100 µl “*Detection Reagent A working*” solüsyonu eklendi ve üzeri örtülen plak 37 °C’de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi tamamlanan plaklar yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı. Yıkama işleminden sonra 100 µl “*Detection Reagent B working*” solüsyon kuyucuklara ilave edildi ve plak üzeri kapatılarak 37 °C’de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Bekleme süresi bitiminde yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkama yapıldı. Daha sonra kuyucuklara 90 µl substrat solüsyonu eklendi ve kuyucuklardaki solüsyonun mavi renge

¹⁴ µ Quant ELISA Reader Bio-Tek Instruments, Inc., Highland Park, USA

dönüştüğü gözlemlendi. Plak karanlıkta ve 37 °C’de 20 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra kuyucuklara 50 µl stop solüsyonu eklendi ve kuyucuklardaki solüsyonun sarı renge dönüştüğü izlendi. Daha sonra plak ELISA optik okuyucu cihazında 450 nm dalga boyunda okutuldu. Standart değerlerin optik okuması sonrası elde edilen verilere göre standart eğri oluşturuldu. Okunan DOS IL-6 ve IL-10 değerleri (pg/ml) sulandırma miktarı (0.5 ml) ile çarpılarak IL-6 ve IL-10 total miktarı (pg) belirlendi. Elde edilen total miktarlar dörde bölünerek 30 sn’de toplanan IL-6 ve IL-10 miktarı (pg/30sn) belirlendi. Birim hacimdeki konsantrasyonları hesaplanırken okunan IL-6 ve IL-10 değerleri (pg/ml) sulandırma miktarı ile çarpıldı ve DOS hacmine (µl) bölündü.

3.5.2. Serum ErbB4, Nrg4, NOS2 ve Arg1 düzeylerinin belirlenmesi

Serum örneklerinin ErbB4, Nrg4, NOS2 ve Arg1 düzeylerinin ölçümleri Selçuk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Araştırma Merkezi’nde ELISA yöntemi ile ticari ELISA kitleri (ErbB4¹⁰, Nrg4¹¹, iNOS¹⁵ ve Arg1¹⁶) kullanılarak gerçekleştirildi.

Donmuş haldeki serum örnekleri oda sıcaklığında çözündürüldükten sonra ELISA için direkt olarak kullanıldı. Standartlar üreticinin direktifleri doğrultusunda hazırlandı. Plak üzerindeki kuyucuklara 100 µl standart ve 100 µl örnek eklendi. Üzeri yapışkan bant ile kapatılan plak 37 °C’de 2 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra yıkama yapılmadan yalnızca kuyucuklardaki sıvı uzaklaştırıldı. Daha sonra kuyucuklara 100 µl “*biotin-antibody* (1x)” eklendi ve plak üzeri kapatılarak 37 °C’de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Bekleme süresi bitiminde yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkama yapıldı. Yıkama sonrası kuyucuklara 100 µl HRP-avidin (1x) solüsyonu ilave edildi ve üzeri kapatılan plak 37 °C’de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi tamamlanan plaklar yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı. Daha sonra kuyucuklara 90 µl TMB substrat eklendi ve kuyucuklardaki solüsyonun mavi renge dönüştüğü gözlemlendi. Plak karanlıkta ve 37 °C’de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra kuyucuklara 50 µl stop solüsyonu eklendi ve kuyucuklardaki solüsyonun sarı renge dönüştüğü izlendi. Daha sonra plak ELISA

¹⁵ CSB-E08148H, Cusabio, Wuhan, China

¹⁶ CSB-EL002005HU, Cusabio, Wuhan, China

optik okuyucu cihazında 450 nm dalga boyunda okutuldu. Standart değerlerin optik okuması sonrası elde edilen verilere göre standart eğri oluşturuldu. Okunan serum ErbB4 (ng/ml), Nrg4 (pg/ml), NOS2 (IU/ml) ve Arg1(ng/ml) değerleri serum konsantrasyonu olarak verildi.

3.6. İstatistiksel Analiz

Her grup için gerekli olan hasta sayısı güç analizi ile belirlendi (G*Power version 3.1.9.2, Heinrich Heine University, Dusseldorf, Germany). Buna göre, gruplar arasındaki farkı belirlemek için en az 0.4 f-tipi etki büyüklüğü seviyesi ve tek yönlü ANOVA yöntemi altında, % 80 güç ile ve $\alpha = 0,05$ anlamlılık düzeyinde her grupta en az 19 kişi olması gerektiği saptandı.

Çalışma sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel analizi istatistik paket programı kullanılarak (SPSS v.23.0; IBM, Chicago, IL, USA) gerçekleştirildi. Verilerin normal dağılım gösterip göstermediği Shapiro–Wilk normalite testi ile değerlendirildi.

Yaş parametresi hariç diğer parametreler normal dağılım göstermedi. Normal dağılım göstermeyen veriler için gruplararası analizde Kruskal–Wallis testi ile Mann-Whitney *U* testi kullanıldı. Normal dağılım gösteren yaş parametresi için ise gruplar arası analizde tek yönlü varyans analizi (*One-Way* ANOVA) ile post-hoc Tukey testi uygulandı. Diğer kategorik veriler Ki-kare testi ile değerlendirildi.

Tedavi sonrası klinik ve biyokimyasal parametrelerdeki grup içi değişikliklerin değerlendirilmesinde, veriler normal dağılım göstermediğinden Wilcoxon işaret sıralama testi kullanıldı. Sonuçların korelasyon analizi için ise Spearman korelasyon testi uygulandı. Sonuçların istatistiksel anlamlılığı $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirildi.

4. BULGULAR

Çalışmamız periodontal olarak sağlıklı 20, plağa bağlı gingivitisli 20, evre II periodontitisli 20 ve evre III periodontitisli 20 olmak üzere toplam 80 gönüllünün katılımıyla tamamlandı. Gingivitis ve periodontitis gruplarındaki bireylerin 1 aylık takip sürecinde cerrahi olmayan periodontal tedaviye bağlı herhangi bir komplikasyon gözlenmedi. Elde edilen klinik ve biyokimyasal veriler gruplar arası ve grup içi karşılaştırmalı olarak değerlendirildi.

Çalışmada yer alan bireylere ait yaş, cinsiyet, VKİ, eğitim durumu, gelir düzeyi, sigara/alkol kullanımı ve mevcut diş sayısı verileri Tablo 4.1’de gösterildi.

Demografik veriler incelendiğinde periodontitis gruplarındaki bireylerin yaş ortalamasının S ve G gruplarına göre yüksek olduğu belirlendi ($p<0,01$). Sağlıklı ve G gruplarındaki bireylerin toplam diş sayılarının P1 ve P2 gruplarındaki bireylerden daha fazla olduğu tespit edildi ($p<0,01$).

Tablo 4.1: Çalışmada yer alan bireylere ait demografik veriler, sosyoekonomik bilgiler, kişisel alışkanlıklar, VKİ ve mevcut diş sayısı verileri

	SAĞLIKLI (S, n=20)	GİNGİVİTİS (G, n=20)	EVRE II DÜZEY B PERİODONTİTİS (P1, n=20)	EVRE III DÜZEY B PERİODONTİTİS (P2, n=20)	<i>p</i>
<u>Yaş</u>					
ort±ss	27,90±6,22	29,30±6,70	40,35 ^{a, b} ±6,92	43,35 ^{a, b} ±8,83	0,00^α
ortanca	26,5	30,0	38,0	43,0	
min-maks	21,0-41,0	21,0-43,0	29,0-54,0	29,0-56,0	
<u>Cinsiyet</u>					
Kadın	11	11	11	9	0,90 [#]
Erkek	9	9	9	11	
<u>VKİ</u>					
ort±ss	24,36±3,22	23,11±3,47	25,29±2,54	25,62±1,67	0,08 [*]
ortanca	24,73	23,27	25,60	25,89	
min-maks	19,10-28,91	17,63-28,34	17,93-28,40	20,81-28,03	
<u>Eğitim durumu</u>					
İlkokul	2	2	5 ^{a, b}	8 ^{a, b}	0,00[*]
Ortaokul-Lise	6	8	8	7	
Üniversite	12	10	7	5	
<u>Gelir düzeyi</u>					
<1000 TL	6	10	8	6	0,31 [*]
1000-3000 TL	3	5	4	10	
>3000 TL	11	5	8	4	
<u>Sigara kullanımı</u>					
Var	5	1	3	1	0,17 [*]
Yok	15	19	17	19	
<u>Alkol kullanımı</u>					
Var	3	4	3	0	0,26 [*]
Yok	17	16	17	20	
<u>Toplam diş sayısı</u>					
ort±ss	27,20±1,20	26,90±1,55	24,65±2,54	23,90±2,97	0,00[*]
ortanca	28,0	27,50	25,0 ^{a, b}	25,0 ^{a, b}	
min-maks	24,0-28,0	23,0-28,0	20,0-28,0	20,0-28,0	

*:Kruskal Wallis- Mann Whitney *U* test, #: Ki-kare Testi, ^α: Tek Yönlü Varyans Analizi, p<0.05.

(a: S grubuna göre farklılık, b: G grubuna göre farklılık)

(n: birey sayısı, ort±ss: ortalama±standart sapma, min: minimum, maks: maksimum, VKİ: Vücut Kitle İndeksi, TL: Türk Lirası)

4.1. Klinik Bulgular

4.1.1. Tüm ağız klinik periodontal parametreler

Çalışma gruplarına ait başlangıç ve cerrahi olmayan periodontal tedavi sonrası 1. aydaki tüm ağız klinik periodontal parametrelerin grup içi ve gruplar arası karşılaştırmaları Tablo 4.2’de toplu olarak verildi.

Gingivitis, P1 ve P2 gruplarına ait tüm ağız başlangıç Pİ, Gİ ve SK değerlerinin S grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edildi ($p<0,001$). P2 grubunun SD ve KAK değerlerinin P1 grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi ($p<0,001$).

Periodontitis gruplarına ait tüm ağız klinik periodontal parametrelerin tamamının tedavi sonrası anlamlı derecede azaldığı tespit edildi ($p<0,01$).

Tablo 4.2: Çalışma gruplarındaki bireylere ait tüm ağız klinik periodontal parametreler

		S (n=20)	G (n=20)	P1 (n=20)	P2 (n=20)	P*
Pİ						
T₀	ort±ss	0,15±0,04	1,42±0,38	1,53±0,34	1,72±0,42	0,00
	ortanca	0,15	1,44 ^a	1,53 ^a	1,61 ^a	
	min-maks	0,07-0,26	0,63-2,51	0,80-2,15	1,18-2,87	
T₁	ort±ss	-	0,27±0,27	0,25±0,10	0,24±0,12	0,65
	ortanca	-	0,21	0,26	0,22	
	min-maks	-	0,05-1,24	0,09-0,43	0,06-0,56	
P[#]		-	0,00	0,00	0,00	
Gİ						
T₀	ort±ss	0,28±0,05	1,62±0,22	1,74±0,12	1,82±0,10	0,00
	ortanca	0,29	1,71 ^a	1,75 ^a	1,80 ^a	
	min-maks	0,09-0,34	1,27-2,03	1,29-1,89	1,65-2,07	
T₁	ort±ss	-	0,41±0,17	0,37±0,13	0,46±0,22	0,37
	ortanca	-	0,42	0,40	0,50	
	min-maks	-	0,05-0,64	0,13-0,56	0,09-0,89	
P[#]		-	0,00	0,00	0,00	
SK (%)						
T₀	ort±ss	7,45±1,64	70,27±16,75	75,59±10,10	78,08±11,34	0,00
	ortanca	7,41	72,73 ^a	78,24 ^a	78,00 ^a	
	min-maks	2,38-8,93	32,05-97,02	44,64-88,69	50,00-96,91	
T₁	ort±ss	-	17,85±7,69	16,95±6,04	19,41±8,75	0,54
	ortanca	-	18,20	15,58	20,00	
	min-maks	-	1,79-31,55	8,33-31,33	1,23-36,42	
P[#]		-	0,00	0,00	0,00	
SD (mm)						
T₀	ort±ss	1,99±0,12	2,06±0,23	2,52±0,39	3,12±0,57	0,00
	ortanca	1,96	2,08 ^a	2,61 ^{a, b}	3,13 ^{a, b, c}	
	min-maks	1,77-2,33	1,71-2,43	1,86-3,09	2,25-4,61	
T₁	ort±ss	-	1,94±0,19	2,09±0,31	2,43±0,41	0,00
	ortanca	-	1,94	2,07	2,37 ^{b, c}	
	min-maks	-	1,51-2,28	1,52-2,64	1,95-3,84	
P[#]		-	0,00	0,00	0,00	
KAK (mm)						
T₀	ort±ss	0,00±0,00	0,00±0,00	3,25±0,49	5,03±0,99	0,00
	ortanca	0,00	0,00	3,50 ^{a, b}	5,01 ^{a, b, c}	
	min-maks	0,00-0,00	0,00-0,00	1,86-3,63	2,50-6,57	
T₁	ort±ss	-	0,00±0,00	2,81±0,49	4,15±0,89	0,00
	ortanca	-	0,00	2,85 ^b	4,15 ^{b, c}	
	min-maks	-	0,00-0,00	1,66-3,52	1,99-5,63	
P[#]		-	1,00	0,00	0,00	

*:Kruskal Wallis- Mann Whitney U test, #: Wilcoxon işaret sıralama testi, $p<0,05$.

(a: S grubuna göre farklılık, b: G grubuna göre farklılık, c: P1 grubuna göre farklılık)

(S: Sağlıklı, G: Gingivitis, P1: Evre II düzey B periodontitis, P2: Evre III düzey B periodontitis, n: birey sayısı, ort±ss: ortalama±standart sapma, min: minimum, maks: maksimum, T₀: başlangıç, T₁: tedavi sonrası 1. ay, Pİ: Plak İndeksi, Gİ: Gingival İndeks, SK: Sondlamada Kanama, SD: Sondlama Derinliği, KAK: Klinik Ataçman Kaybı)

4.1.2. Örnek alınan diş bölgelerine ait klinik periodontal parametreler

Örnekleme yapılan diş bölgelerine ait başlangıç ve tedavi sonrası 1. aydaki SD ve KAK değerleri Tablo 4.3'te verildi. Buna göre P1 ve P2 gruplarındaki başlangıç SD verilerine ait minimum ve maksimum değerler sırasıyla 4,00-5,00 mm ve 6,00-8,00 mm iken; KAK verilerine ait minimum ve maksimum değerler sırasıyla 3,00-4,00 mm ve 5,00-9,00 mm idi.

Tablo 4.3: Çalışma gruplarındaki bireylerin örnek alınan diş bölgelerine ait sondlama derinliği ve klinik ataçman kaybı verileri

		SD		KAK	
		T ₀	T ₁	T ₀	T ₁
S GRUBU (n=80)	1. BÖLGE ort±ss ortanca min-maks	2,15±0,37 2,00 2,00-3,00	- - -	0,00±0,00 0,00 0,00-0,00	- - -
	2. BÖLGE ort±ss ortanca min-maks	2,15±0,49 2,00 1,00-3,00	- - -	0,00±0,00 0,00 0,00-0,00	- - -
	3. BÖLGE ort±ss ortanca min-maks	2,15±0,37 2,00 2,00-3,00	- - -	0,00±0,00 0,00 0,00-0,00	- - -
	4. BÖLGE ort±ss ortanca min-maks	2,10±0,55 2,00 1,00-3,00	- - -	0,00±0,00 0,00 0,00-0,00	- - -
G GRUBU (n=80)	1. BÖLGE ort±ss ortanca min-maks	2,55±0,51 3,00 2,00-3,00	2,35±0,59 2,00 1,00-3,00	0,00±0,00 0,00 0,00-0,00	0,00±0,00 0,00 0,00-0,00
	2. BÖLGE ort±ss ortanca min-maks	2,60±0,50 3,00 2,00-3,00	2,20±0,41 2,00 2,00-3,00	0,00±0,00 0,00 0,00-0,00	0,00±0,00 0,00 0,00-0,00
	3. BÖLGE ort±ss ortanca min-maks	2,60±0,50 3,00 2,00-3,00	2,30±0,57 2,00 1,00-3,00	0,00±0,00 0,00 0,00-0,00	0,00±0,00 0,00 0,00-0,00
	4. BÖLGE ort±ss ortanca min-maks	2,60±0,50 3,00 2,00-3,00	2,30±0,57 2,00 1,00-3,00	0,00±0,00 0,00 0,00-0,00	0,00±0,00 0,00 0,00-0,00

Tablo 4.3 (devamı): Çalışma gruplarındaki bireylerin örnek alınan diş bölgelerine ait sondlama derinliği ve klinik ataçman kaybı verileri

		SD		KAK	
		T ₀	T ₁	T ₀	T ₁
P1 GRUBU (n=80)	1 BÖLGE				
	ort±ss	4,10±0,31	2,55±0,69	3,90±0,31	3,25±0,55
	ortanca	4,00	2,00	4,00	3,00
	min-maks	4,00-5,00	2,00-4,00	3,00-4,00	2,00-4,00
	2 BÖLGE				
	ort±ss	4,10±0,31	2,55±0,69	3,90±0,31	3,20±0,52
	ortanca	4,00	2,00	4,00	3,00
	min-maks	4,00-5,00	2,00-4,00	3,00-4,00	2,00-4,00
	3 BÖLGE				
	ort±ss	4,05±0,22	2,50±0,69	3,90±0,31	3,35±0,49
	ortanca	4,00	2,00	4,00	3,00
	min-maks	4,00-5,00	2,00-4,00	3,00-4,00	3,00-4,00
P2 GRUBU (n=80)	4 BÖLGE				
	ort±ss	4,10±0,31	2,65±0,67	3,90±0,31	3,20±0,70
	ortanca	4,00	3,00	4,00	3,00
	min-maks	4,00-5,00	2,00-4,00	3,00-4,00	2,00-4,00
	1 BÖLGE				
	ort±ss	6,15±0,49	3,35±0,59	6,20±0,89	4,95±1,15
	ortanca	6,00	3,00	6,00	5,00
	min-maks	6,00-8,00	3,00-5,00	5,00-8,00	3,00-7,00
	2 BÖLGE				
	ort±ss	6,10±0,45	3,30±0,57	6,40±0,99	5,00±0,97
	ortanca	6,00	3,00	6,00	5,00
	min-maks	6,00-8,00	3,00-5,00	5,00-8,00	3,00-7,00
	3 BÖLGE				
	ort±ss	6,10±0,31	3,30±0,57	6,75±1,02	5,15±1,04
	ortanca	6,00	3,00	6,50	5,00
	min-maks	6,00-7,00	3,00-5,00	5,00-9,00	4,00-7,00
	4 BÖLGE				
	ort±ss	6,10±0,31	3,20±0,52	6,30±0,98	5,00±0,86
	ortanca	6,00	3,00	6,00	5,00
	min-maks	6,00-7,00	2,00-4,00	5,00-9,00	4,00-7,00

S: Sağlıklı, G: Gingivitis, P1: Evre II düzey B periodontitis, P2: Evre III düzey B periodontitis, n: örnek alınan bölge sayısı, ort±ss: ortalama±standart sapma, min:minimum, maks:maksimum, T₀: başlangıç, T₁: tedavi sonrası 1. ay, SD: Sondlama Derinliği, KAK: Klinik Ataçman Kaybı

Çalışmaya katılan bireylerin örnek alınan diş bölgelerine ait Pİ, PKİ, SD ve KAK ölçümlerinin ortalamaları alınarak bireye ait değerler belirlendi. Daha sonra bireylere ait Pİ, PKİ, SD ve KAK değerlerinin ortalaması alınarak çalışma gruplarına ait ortalama değer hesaplandı. Çalışma gruplarının örnek alınan diş bölgelerine ait başlangıç ve 1. aydaki klinik periodontal ölçümlerin ve DOS hacim değerlerinin ortalamalarının grup içi ve gruplar arası karşılaştırmaları Tablo 4.4'te özetlendi.

Tablo 4.4: Çalışma gruplarındaki bireylerin örnek alınan diş bölgelerine ait klinik periodontal parametre ve DOS hacim değerleri

		S (n=20)	G (n=20)	P1 (n=20)	P2 (n=20)	P*
Pİ						
T₀	ort±ss	0,44±0,37	1,75±0,56	1,81±0,60	1,94±0,53	0,00
	ortanca min-	0,50	1,63 ^a	1,75 ^a	1,88 ^a	
	maks	0,00-1,00	1,00-3,00	0,50-3,00	0,75-3,00	
T₁	ort±ss	-	0,26±0,34	0,44±0,28	0,46±0,32	0,05
	ortanca min-	-	0,13	0,50 ^b	0,50 ^b	
	maks	-	0,00-1,25	0,00-1,00	0,00-1,25	
P[#]		-	0,00	0,00	0,00	
PKİ						
T₀	ort±ss	0,00±0,00	2,80±0,57	2,74±0,56	2,76±0,50	0,00
	ortanca min-	0,00	2,75 ^a	2,50 ^a	2,50 ^a	
	maks	0,00-0,00	2,25-4,00	2,25-4,00	2,25-3,75	
T₁	ort±ss	-	0,34±0,39	0,31±0,43	0,55±0,42	0,09
	ortanca min-	-	0,25	0,25	0,50	
	maks	-	0,00-1,00	0,00-1,75	0,00-1,50	
P[#]		-	0,00	0,00	0,00	
SK (%)						
T₀	ort±ss	0,00±0,00	100,00±0,00	100,00±0,00	100,00±0,00	0,00
	ortanca min-	0,00	100,00 ^a	100,00 ^a	100,00 ^a	
	maks	0,00-0,00	100,00-100,00	100,00-100,00	100,00-100,00	
T₁	ort±ss	-	7,50±11,75	18,75±24,16	31,25±27,95	0,01
	ortanca min-	-	0,00	12,50	25,00 ^b	
	maks	-	0,00-25,00	0,00-75,00	0,00-75,00	
P[#]		-	0,00	0,00	0,00	
SD (mm)						
T₀	ort±ss	2,14±0,25	2,59±0,34	4,09±0,23	6,11±0,22	0,00
	ortanca min-	2,25	2,63 ^a	4,00 ^{a, b}	6,00 ^{a, b, c}	
	maks	1,50-2,50	2,00-3,00	4,00-5,00	6,00-6,75	
T₁	ort±ss	-	2,29±0,36	2,56±0,56	3,29±0,47	0,00
	ortanca min-	-	2,25	2,50	3,00 ^{b, c}	
	maks	-	1,50-2,75	2,00-3,75	2,75-4,50	
P[#]		-	0,00	0,00	0,00	
KAK (mm)						
T₀	ort±ss	0,00±0,00	0,00±0,00	3,90±0,25	6,41±0,78	0,00
	ortanca min-	0,00	0,00	4,00 ^{a, b}	6,50 ^{a, b, c}	
	maks	0,00-0,00	0,00-0,00	3,25-4,00	5,25-8,00	
T₁	ort±ss	-	0,00±0,00	3,25±0,51	5,03±0,92	0,00
	ortanca min-	-	0,00	3,00 ^b	5,00 ^{b, c}	
	maks	-	0,00-0,00	2,50-4,00	3,50-6,75	
P[#]		-	-	0,00	0,00	

Tablo 4.4 (devamı): Çalışma gruplarındaki bireylerin örnek alınan diş bölgelerine ait klinik periodontal parametre ve DOS hacim değerleri

	S (n=20)	G (n=20)	P1 (n=20)	P2 (n=20)	P*
DOS HACMI (µl)					
T₀					
ort±ss	0,26±0,10	0,38±0,22	0,43±0,23	0,42±0,16	0,01
ortanca	0,26	0,32	0,37 ^a	0,38 ^a	
min-maks	0,06-0,45	0,10-0,93	0,19-1,06	0,18-0,70	
T₁					
ort±ss	-	0,27±0,13	0,33±0,14	0,30±0,11	0,37
ortanca	-	0,25	0,30	0,29	
min-maks	-	0,11-0,53	0,16-0,65	0,08-0,49	
P[#]	-	0,10	0,31	0,02	

*:Kruskal Wallis- Mann Whitney U test, #: Wilcoxon işaret sıralama testi, p<0.05.

(a: S grubuna göre farklılık, b: G grubuna göre farklılık, c: P1 grubuna göre farklılık)

(S: Sağlıklı, G: Gingivitis, P1: Evre II düzey B periodontitis, P2: Evre III düzey B periodontitis, n: birey sayısı, ort±ss: ortalama±standart sapma, min:minimum, maks:maksimum, T₀: başlangıç, T₁: tedavi sonrası 1. ay, Pİ: Plak İndeksi, PKİ: Papil Kanama İndeksi, SK: Sondlamada Kanama, SD: Sondlama Derinliği, KAK: Klinik Ataçman Kaybı, DOS: Diş Eti Oluşu Sıvısı)

Örnek alınan diş bölgelerine ait başlangıç Pİ, PKİ ve SK değerleri beklenildiği gibi S grubunda diğer gruplara göre anlamlı derecede düşüktü. (p<0,001). P2 grubuna ait SD ve KAK değerleri P1 grubundan anlamlı derecede yüksekti (p<0,001). P1 ve P2 gruplarında başlangıç DOS hacimlerinin S grubuna göre yüksek olduğu (p<0,01), diğer taraftan G grubundan farklı olmadığı belirlendi (p>0,05).

G, P1 ve P2 gruplarında örnek alınan diş bölgelerine ait Pİ, PKİ, SK ve SD değerlerinin tedavi sonrası anlamlı derecede azaldığı saptandı (p<0,01). P1 ve P2 gruplarında 1. ay KAK değerlerinin başlangıç seviyelerine göre anlamlı derecede daha düşük olduğu belirlendi (p<0,01). Tüm gruplarda 1. ayda DOS hacimlerinin azaldığı görülmekle birlikte (p>0,05) yalnızca P2 grubundaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p<0,05).

4.2. Biyokimyasal Bulgular

Çalışma gruplara ait başlangıç ve cerrahi olmayan periodontal tedavi sonrası birinci aydaki DOS ErbB4, Nrg4, IL-6 ve IL-10 total miktar ve konsantrasyon değerleri Tablo 4.5 ve Tablo 4.6'da özetlendi.

Tablo 4.5: Çalışma gruplarındaki bireylere ait başlangıç ve tedavi sonrası 1. aydaki DOS ErbB4, Nrg4, IL-6, IL-10 total miktarları ve IL-6/IL-10 oranı

DOS TOTAL MİKTAR					
	S (n=20)	G (n=20)	P1 (n=20)	P2 (n=20)	P*
ErbB4 (pg/30 sn)					
T₀	ort±ss	18,22±15,44	32,10±21,79	40,16±27,69	59,22±44,71
	ortanca	13,88	34,63 ^a	27,88 ^a	45,76 ^a
	min-maks	4,00-60,63	4,13-69,00	15,75-114,88	15,13-160,50
T₁	ort±ss	-	13,52±10,81	18,63±15,32	17,17±27,02
	ortanca	-	8,88	19,88	8,82
	min-maks	-	2,50-34,25	1,88-62,75	1,88-123,00
p[#]		0,01	0,02	0,01	
Nrg4 (pg/30 sn)					
T₀	ort±ss	2,32±2,11	5,42±5,15	5,69±4,03	9,52±6,58
	ortanca	1,62	3,77 ^a	5,66 ^a	8,76 ^{a, b}
	min-maks	0,25-7,00	0,25-18,23	0,25-14,01	0,26-28,13
T₁	ort±ss	-	2,04±2,18	2,64±2,48	0,97±0,89
	ortanca	-	1,21	2,16	0,81
	min-maks	-	0,24-7,54	0,25-7,00	0,23-2,96
p[#]		0,02	0,03	0,00	
IL-6 (pg/30 sn)					
T₀	ort±ss	0,01±0,01	0,01±0,01	0,01±0,01	0,01±0,02
	ortanca	0,01	0,01	0,01	0,01
	min-maks	0,004-0,03	0,004-0,03	0,004-0,04	0,004-0,10
T₁	ort±ss	-	0,01±0,003	0,01±0,002	0,01±0,01
	ortanca	-	0,01	0,01	0,01
	min-maks	-	0,004-0,02	0,004-0,01	0,004-0,03
p[#]		-	0,07	0,21	0,62
IL-10 (pg/30 sn)					
T₀	ort±ss	1,69±1,41	0,28±0,59	0,30±0,61	0,11±0,24
	ortanca	1,76	0,044 ^a	0,043 ^a	0,038 ^{a, c}
	min-maks	0,04-4,31	0,03-2,48	0,02-2,11	0,03-1,00
T₁	ort±ss	-	1,47±2,34	0,77±1,19	0,71±0,98
	ortanca	-	0,05	0,05	0,04
	min-maks	-	0,04-8,53	0,03-3,87	0,04-2,93
p[#]		-	0,05	0,23	0,00
IL-6/IL-10					
T₀	ort±ss	0,05±0,07	0,26±0,27	0,16±0,22	0,41±0,68
	ortanca	0,003	0,14 ^a	0,12 ^a	0,16 ^{a, c}
	min-maks	0,001-0,23	0,002-0,86	0,002-1,01	0,005-2,54
T₁	ort±ss	-	0,07±0,07	0,07±0,06	0,07±0,06
	ortanca	-	0,09	0,09	0,11
	min-maks	-	0,001-0,17	0,001-0,14	0,002-0,15
p[#]		-	0,02	0,10	0,00

*:Kruskal Wallis- Mann Whitney U test, #:Wilcoxon işaret sıralama testi, p<0.05.

(a: S grubuna göre farklılık, b: G grubuna göre farklılık, c: P1 grubuna göre farklılık)

(S: Sağlıklı, G: Gingivitis, P1: Evre II düzey B periodontitis, P2: Evre III düzey B periodontitis, n: birey sayısı, ort±ss: ortalama±standart sapma, min: minimum, maks: maksimum, T₀: başlangıç, T₁: tedavi sonrası 1. ay, DOS: Diş Eti Oluğu Sıvısı, ErbB4: Erb-b2 reseptör tirozin kinaz 4, Nrg4: Neuregulin 4, IL: İnterlökin)

Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında S grubundaki DOS ErbB4 ve Nrg4 total miktarlarının G, P1 ve P2 gruplarına göre anlamlı derecede düşük olduğu tespit edildi (p<0,05). İlave olarak P2 grubunun DOS Nrg4 seviyesinin G grubuna göre anlamlı yüksek olduğu saptandı (p<0,05). S grubunda IL-10 miktarının diğer çalışma gruplarına göre anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü (p<0,001). IL6/IL-10

oranının ise S grubunda diğer gruplardan daha düşük olduğu ($p<0,01$) ve P2 grubunda P1 grubundan daha yüksek olduğu saptandı ($p<0,05$). DOS IL-6 total miktarı bakımından ise gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0,05$).

Gingivitis, P1 ve P2 gruplarında ErbB4 ve Nrg4 DOS total seviyelerinin 1. ayda başlangıca göre anlamlı derecede azaldığı tespit edildi ($p<0,05$). Gingivitis ve P2 gruplarında DOS IL-10 total miktarının 1. ayda başlangıca göre daha yüksek olduğu ($p\leq 0,05$), IL-6/IL-10 oranının ise tedavi sonrası anlamlı düzeyde azaldığı belirlendi ($p<0,05$). Evre II periodontitis grubunda tedavi sonrası DOS IL-10 miktarının arttığı, IL-6/IL-10 oranının ise azaldığı belirlense de bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$).

Tablo 4.6: Çalışma gruplarındaki bireylere ait başlangıç ve tedavi sonrası 1. aydaki DOS ErbB4, Nrg4, IL-6 ve IL-10 konsantrasyonları

DOS KONSANTRASYON					
	S (n=20)	G (n=20)	P1 (n=20)	P2 (n=20)	P*
ErbB4 (pg/μl)					
T₀	ort±ss	80,33±84,68	101,00±84,25	101,04±80,53	0,34
	ortanca	61,43	77,09	65,98	
	min-maks	10,13-342,00	11,79-320,83	17,74-270,29	
T₁	ort±ss	-	64,28±64,73	62,07±53,94	0,55
	ortanca	-	31,32	38,39	
	min-maks	-	6,80-193,65	5,64-162,70	
p[#]	-	0,09	0,10	0,01	
Nrg4 (pg/μl)					
T₀	ort±ss	12,69±15,43	15,17±13,16	23,92±23,06	0,02
	ortanca	6,41	13,35	15,93 ^a	
	min-maks	0,66-56,03	0,97-53,88	1,21-92,51	
T₁	ort±ss	-	9,30±10,59	10,73±8,73	0,18
	ortanca	-	4,60	11,38	
	min-maks	-	0,47-31,43	0,74-27,20	
p[#]	-	0,08	0,03	0,00	
IL-6 (pg/μl)					
T₀	ort±ss	0,03±0,01	0,03±0,02	0,02±0,02	0,16
	ortanca	0,02	0,02	0,01	
	min-maks	0,01-0,06	0,01-0,07	0,01-0,08	
T₁	ort±ss	-	0,03±0,02	0,03±0,04	0,85
	ortanca	-	0,02	0,02	
	min-maks	-	0,01-0,06	0,01-0,16	
p[#]	-	0,82	0,18	0,60	

Tablo 4.6 (devamı): Çalışma gruplarındaki bireylere ait başlangıç ve tedavi sonrası 1. aydaki DOS ErbB4, Nrg4, IL-6 ve IL-10 konsantrasyonları

DOS KONSANTRASYON					
	S (n=20)	G (n=20)	P1 (n=20)	P2 (n=20)	P*
IL-10 (pg/μl)					
T₀					
ort±ss	6,54±5,85	0,84±1,47	0,48±0,81	0,48±0,98	0,00
ortanca	5,27	0,16 ^a	0,14 ^a	0,11 ^a	
min-maks	0,09-15,80	0,06-5,39	0,05-3,05	0,04-3,46	
T₁					
ort±ss	-	5,99±9,04	5,65±13,64	2,00±2,89	0,29
ortanca	-	0,36	0,19	0,16	
min-maks	-	0,07-25,11	0,07-59,90	0,08-9,51	
p[#]	-	0,02	0,08	0,05	

*:Kruskal Wallis- Mann Whitney U test, #:Wilcoxon işaret sıralama testi, p<0.05. (a: S grubuna göre farklılık, b: G grubuna göre farklılık)

(S: Sağlıklı, G: Gingivitis, P1: Evre II düzey B periodontitis, P2: Evre III düzey B periodontitis, n: birey sayısı, ort±ss: ortalama±standart sapma, min: minimum, maks: maksimum, T₀: başlangıç, T₁: tedavi sonrası 1. ay, DOS: Diş Eti Oluğu Sıvısı, ErbB4: Erb-b2 reseptör tirozin kinaz 4, Nrg4: Neuregulin 4, IL: İnterlökin)

Çalışma başlangıcında DOS Nrg4 konsantrasyonunun P1 grubunda S grubuna göre, P2 grubunda hem S hem G grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğu bulundu (p<0,05). DOS ErbB4 konsantrasyonu ise gruplar arasında farklı değildi (p> 0,05). S grubuna ait DOS IL-10 konsantrasyon değerlerinin diğer gruplardan yüksek olduğu görüldü (p<0,01).

Gingivitis grubunda DOS ErbB4 ve Nrg4 konsantrasyonlarının 1. ayda başlangıca göre azaldığı fakat bu sonucun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu (p>0,05). DOS IL-10 konsantrasyonunun tedavi sonrası anlamlı derecede artış gösterdiği saptandı (p<0,05). P1 grubunda DOS ErbB4 ve Nrg4 konsantrasyonlarının tedavi sonrası 1. ayda başlangıca göre azaldığı tespit edilmekle birlikte yalnızca Nrg4 seviyesindeki azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu (p<0,05). P2 grubunda DOS ErbB4 ve Nrg4 konsantrasyonlarının 1. ayda başlangıca göre anlamlı derecede azaldığı (p<0,05), IL-10 seviyesinin ise tedavi sonrası anlamlı derecede arttığı belirlendi (p= 0,05).

Diş eti oluk sıvısı ErbB4, Nrg4, IL-6 ve IL-10 seviyeleri (total miktar ve konsantrasyon) açısından, cerrahi olmayan periodontal tedavi sonrası 1. ayda çalışma grupları arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmedi (p>0,05).

Çalışma gruplara ait başlangıç ve cerrahi olmayan periodontal tedavi sonrası birinci aydaki serum ErbB4, Nrg4, NOS2 ve Arg1 düzeyleri Tablo 4.7’de verildi.

Tablo 4.7: Çalışma gruplarının başlangıç ve tedavi sonrası 1. aydaki serum ErbB4, Nrg4, NOS2 ve Arg1 konsantrasyonları

SERUM KONSANTRASYON					
	S (n=20)	G (n=20)	P1 (n=20)	P2 (n=20)	P*
ErbB4 (pg/ml)					
T₀	ort±ss	1168,58±551,04	1416,30±449,11	1145,25±638,10	1530,45±560,14
	ortanca	1092,00	1276,00	1021,00	1479,00 ^{a, c}
	min-maks	254,00-2237,00	715,00-2418,00	209,00-2892,00	861,00-3083,00
T₁	ort±ss	-	1315,80±443,78	1314,05±723,96	1420,30±616,70
	ortanca	-	1324,50	1247,50	1360,00
	min-maks	-	654,00-2239,00	450,00-3043,00	195,00-2570,00
p[#]	-	0,49	0,46	0,71	
Nrg4 (pg/ml)					
T₀	ort±ss	110,77±82,98	93,00±52,70	83,39±55,26	120,90±113,71
	ortanca	80,20	63,05	73,01	82,41
	min-maks	13,27-291,43	34,29-196,43	13,27-225,65	14,38-402,86
T₁	ort±ss	-	82,29±72,47	71,62±56,97	90,43±53,16
	ortanca	-	53,10	63,05	78,54
	min-maks	-	11,06-268,57	1,11-235,65	18,81-241,88
p[#]	-	0,56	0,85	0,89	
NOS2 (IU/ml)					
T₀	ort±ss	1,33±1,56	3,24±2,80	2,91±2,32	3,45±2,69
	ortanca	0,95	1,85 ^a	1,70 ^a	1,71 ^a
	min-maks	0,07-6,64	0,14-8,70	0,43-7,32	0,76-9,38
T₁	ort±ss	-	1,86±2,10	2,00±1,80	2,97±2,21
	ortanca	-	1,28	1,29	1,65
	min-maks	-	0,05-7,68	0,20-6,59	0,83-7,03
p[#]	-	0,04	0,07	0,03	
Arg1 (ng/ml)					
T₀	ort±ss	5,63±5,39	1,75±2,34	1,93±2,78	1,68±1,61
	ortanca	1,69	0,86 ^a	0,95 ^a	1,43 ^a
	min-maks	0,89-14,53	0,25-8,21	0,06-8,94	0,08-6,98
T₁	ort±ss	-	5,28±6,12	3,85±4,91	4,07±3,93
	ortanca	-	2,25	2,26	2,15
	min-maks	-	0,34-20,09	0,11-16,34	0,22-12,57
p[#]	-	0,06	0,46	0,08	

*:Kruskal Wallis- Mann Whitney U test, #:Wilcoxon işaret sıralama testi, p<0.05.

(S: Sağlıklı, G: Gingivitis, P1: Evre II düzey B periodontitis, P2: Evre III düzey B periodontitis, n: birey sayısı, ort±ss: ortalama±standart sapma, min: minimum, maks: maksimum, T₀: başlangıç, T₁: tedavi sonrası 1. ay, ErbB4: Erb-b2 reseptor tirozin kinaz 4, Nrg4: Neuregulin 4, NOS2: Nitrik Oksit Sentaz 2, Arg1:Arjinaz 1)

Serum konsantrasyonları incelendiğinde P2 grubunda ErbB4 seviyesinin S ve P1 grubundan anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edildi (p<0,05). Serum Arg1 seviyesi S grubunda diğer gruplardan anlamlı derecede daha yüksek iken (p<0,05), NOS2 seviyesi ise S grubunda diğer gruplardan daha düşüktü (p<0,05).

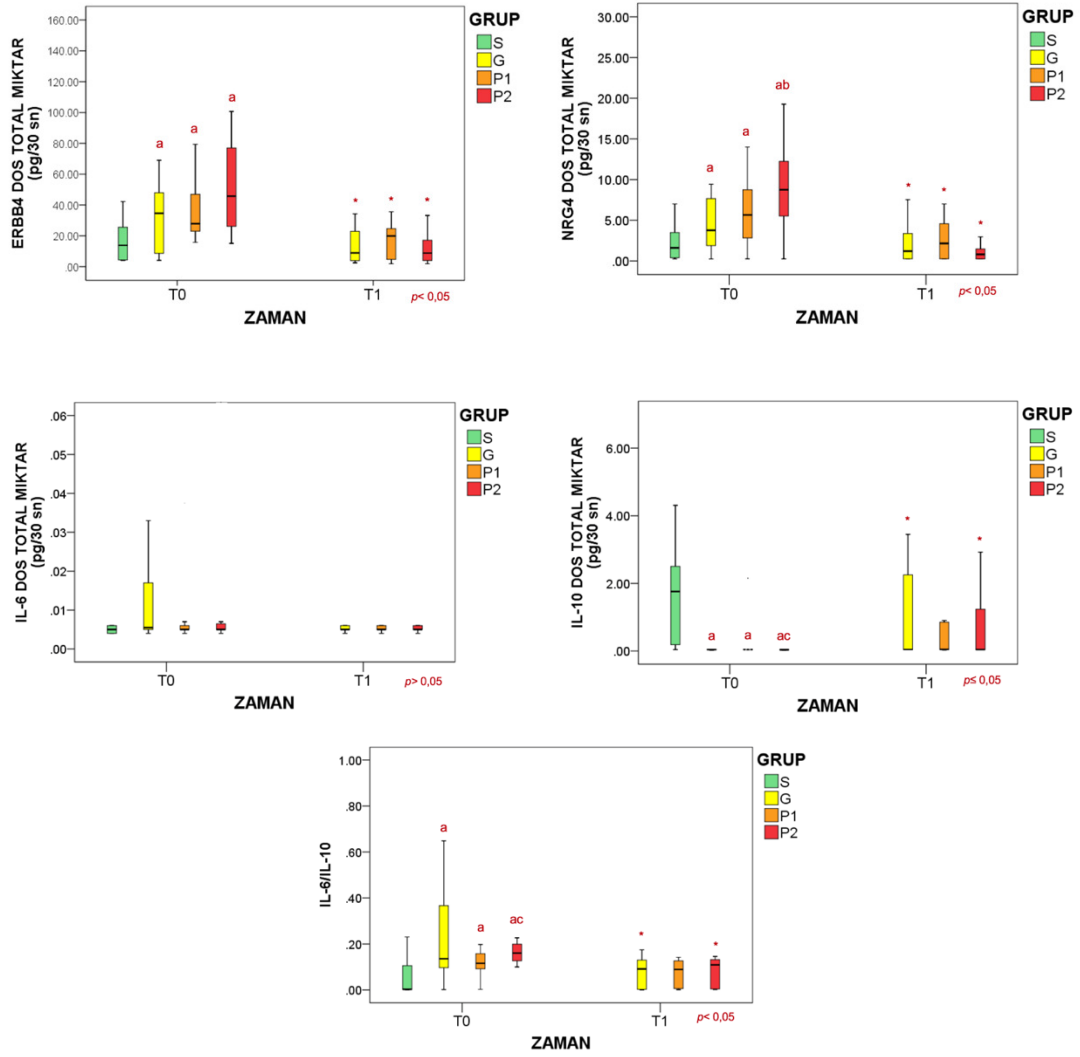
Gingivitis, P1 ve P2 gruplarında tedavi sonrası 1. ayda serum ErbB4 ve Nrg4 düzeylerinde anlamlı bir değişim görülmedi (p>0,05). Tedavi sonrası 1. ayda G ve P2 gruplarında NOS2 seviyesinin anlamlı düzeyde azaldığı saptandı (p<0,05).

Birinci aydaki serum Arg1 seviyelerinin ise tüm gruplarda başlangıca göre yüksek olduğu fakat bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p > 0,05$).

Serum ErbB4, Nrg4, NOS2 ve Arg1 konsantrasyonları açısından, cerrahi olmayan periodontal tedavi sonrası 1. ayda çalışma grupları arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($p > 0,05$).

Çalışmada değerlendirilen DOS ErbB4, Nrg4, IL-6 ve IL-10 total miktarları ile serum ErbB4, Nrg4, NOS2 ve Arg1 konsantrasyonlarının gruplara ve zamana göre dağılımları Figür 4.1 ve Figür 4.2’de gösterildi.

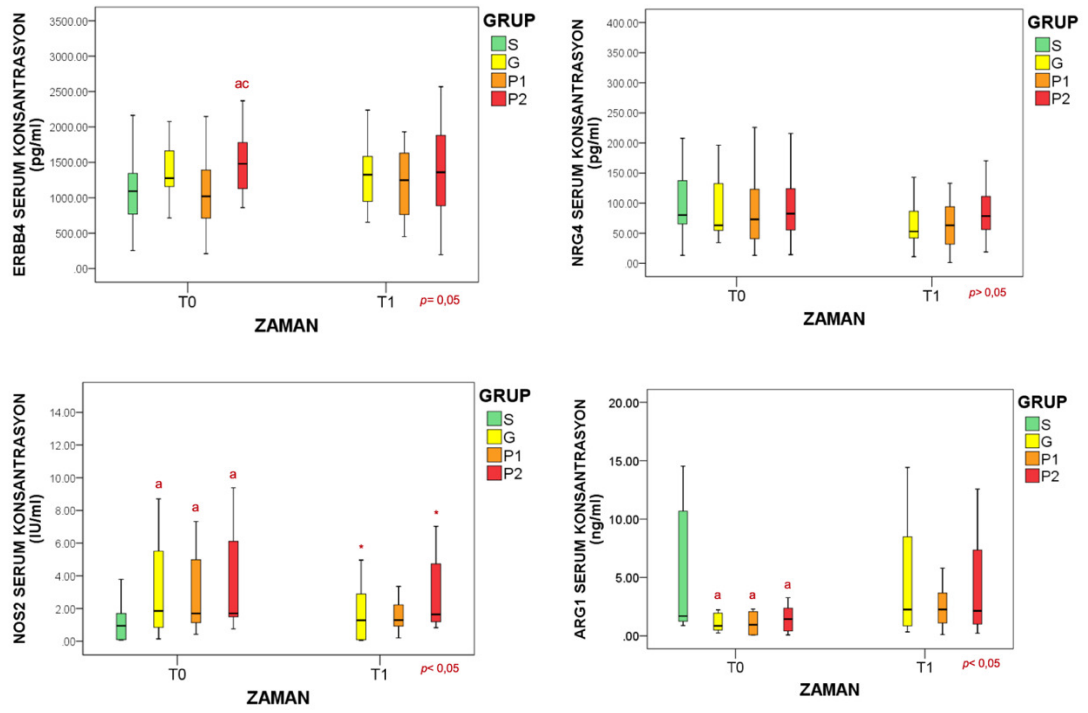




Figür 4.1: DOS ErbB4, Nrg4, IL-6 ve IL-10 total miktarları ile IL-6/IL-10 oranının gruplara ve zamana göre dağılımları

a: S grubuna göre farklılık, b: P1 grubuna göre farklılık, c: P2 grubuna göre farklılık, *: T₀'a göre farklılık

(G: Gingivitis, P1: Evre II düzey B periodontitis, P2: Evre III düzey B periodontitis, T₀: başlangıç, T₁: tedavi sonrası 1. ay, DOS: Dış Eti Oluğu Sıvısı, ErbB4: Erb-b2 reseptor tirozin kinaz 4, Nrg4: Neuregulin 4, IL: İnterlökin)



Figür 4.2: Serum ErbB4, Nrg4, NOS2 ve Arg1 konsantrasyonlarının gruplara ve zamana göre dağılımları

a: S grubuna göre farklılık, c: P2 grubuna göre farklılık, *: T₀'a göre farklılık

(G: Gingivitis, P1: Evre II düzey B periodontitis, P2: Evre III düzey B periodontitis, T₀: başlangıç, T₁: tedavi sonrası 1. ay, ErbB4: Erb-b2 reseptör tirozin kinaz 4, Nrg4: Neuregulin 4, NOS2: Nitrik Oksit Sentaz 2, Arg1: Arjinaz 1)

4.3. Korelasyon Analizleri

4.3.1. Çalışma geneli klinik ve biyokimyasal korelasyonlar

Çalışma popülasyonunun başlangıç DOS bulguları ile örnek alınan diş bölgelerine ait periodontal klinik parametreleri arasındaki Spearman korelasyonu sonuçları Tablo 4.8’de gösterildi.

Tablo 4.8: Başlangıç DOS bulguları ile örnek alınan diş bölgelerine ait klinik parametreler arasındaki Spearman korelasyonu

			PI	PKİ	SK	SD	KAK	DOS HACMİ (µl)
DOS TOTAL MİKTAR	ErbB4	r	.290*	.308**	.419**	.380**	.401**	.249*
		p	.012	.008	.000	.001	.000	.033
	Nrg4	r	.259*	.392**	.419**	.428**	.425**	.251*
		p	.023	.000	.000	.000	.000	.028
	IL-6	r	.143	.017	.199	.031	.000	.137
		p	.214	.883	.082	.789	1.000	.235
	IL-10	r	-.287*	-.372**	-.562**	-.466**	-.401**	-.207
		p	.013	.001	.000	.000	.000	.075
	IL-6/IL-10	r	.201	.233*	.492**	.340**	.277*	.212
		p	.090	.048	.000	.004	.019	.074
DOS KONSANTRASYON	ErbB4	r	.084	.127	.192	.101	.149	-.214
		p	.470	.270	.094	.381	.195	.061
	Nrg4	r	.171	.292*	.300**	.310**	.339**	-.123
		p	.144	.011	.009	.007	.003	.292
	IL-6	r	-.152	-.269*	-.172	-.272*	-.269*	-.661**
		p	.194	.020	.140	.018	.020	.000
	IL-10	r	-.281*	-.419**	-.544**	-.483**	-.400**	-.551**
		p	.015	.000	.000	.000	.000	.000

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$.

(PI: Plak İndeksi, PKİ: Papil Kanama İndeksi, SK: Sondlamada Kanama, SD: Sondlama Derinliği, KAK: Klinik Ataçman Kaybı, DOS: Diş Eti Oluğu Sıvısı, ErbB4: Erb-b2 reseptör tirozin kinaz 4, Nrg4: Neuregulin 4, IL: İnterlökin)

Çalışma popülasyonunun başlangıç serum bulguları ile tüm ağız periodontal klinik parametreleri arasındaki Spearman korelasyonu sonuçları Tablo 4.9’da verildi.

Tablo 4.9: Başlangıç serum bulguları ile tüm ağız klinik parametreler arasındaki Spearman korelasyonu

SERUM KONSANTRASYON	ErbB4		Pİ	Gİ	SK	SD	KAK
		<i>r</i>	.117	.208	.223*	.117	.067
	Nrg4	<i>p</i>	.303	.065	.049	.306	.558
		<i>r</i>	.074	-.093	.042	-.017	-.035
	NOS2	<i>p</i>	.536	.437	.728	.890	.771
		<i>r</i>	.413**	.351**	.393**	.369**	.248*
	Arg1	<i>p</i>	.000	.002	.001	.001	.034
		<i>r</i>	-.206	-.308**	-.133	-.158	-.130
		<i>p</i>	.084	.009	.269	.188	.282

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$.

(Pİ: Plak İndeksi, Gİ: Gingival İndeks, SK: Sondlamada Kanama, SD: Sondlama Derinliği, KAK: Klinik Ataçman Kaybı, DOS: Diş Eti Oluğu Sıvısı, ErbB4: Erb-b2 reseptör tirozin kinaz 4, Nrg4: Neuregulin 4, NOS2: Nitrik Oksit Sentaz 2, Arg1: Arjinaz 1)

Korelasyon sonuçları değerlendirildiğinde;

1. DOS ErbB4 total miktarı ile;

örnek alınan bölgelere ait SK değeri arasında pozitif orta düzeyde korelasyon; Pİ, PKİ, SD, KAK ve DOS hacmi arasında pozitif zayıf korelasyon,

2. DOS Nrg4 total miktarı ile;

örnek alınan bölgelere ait SK, SD ve KAK değerleri arasında pozitif orta düzeyde korelasyon; Pİ, PKİ ve DOS hacmi arasında pozitif zayıf korelasyon,

3. DOS IL-10 total miktarı ile;

örnek alınan bölgelere ait SK, SD ve KAK değerleri arasında negatif orta düzeyde korelasyon; Pİ ve PKİ arasında negatif zayıf korelasyon,

4. DOS IL-6/IL-10 oranı ile;

örnek alınan bölgelere ait SK değeri arasında pozitif orta düzeyde korelasyon; PKİ, SD ve KAK değerleri arasında pozitif zayıf korelasyon,

5. DOS Nrg4 konsantrasyonu ile örnek alınan bölgelere ait PKİ, SK, SD ve KAK değerleri arasında pozitif zayıf korelasyon,

6. DOS IL-6 DOS konsantrasyonu ile;

DOS hacmi arasında negatif güçlü korelasyon; örnek alınan bölgelere ait PKİ, SD ve KAK değerleri arasında negatif zayıf korelasyon,

7. DOS IL-10 DOS konsantrasyonu ile;

örnek alınan bölgelere ait PKİ, SK, SD, KAK ve DOS hacmi arasında negatif güçlü korelasyon; Pİ değeri arasında negatif zayıf korelasyon,

8. Serum Erbb4 konsantrasyonu ile tüm ağız SK değeri arasında pozitif zayıf korelasyon,

9. Serum NOS2 konsantrasyonu ile;
tüm ağız Pİ değeri arasında pozitif orta düzey korelasyon; Gİ, SK, SD ve KAK değeri arasında pozitif zayıf korelasyon,

10. Serum Arg1 konsantrasyonu ile tüm ağız Gİ değeri arasında negatif zayıf korelasyon olduğu tespit edildi.

4.3.2. Çalışma geneli biyokimyasal korelasyonlar

Çalışma popülasyonunun başlangıca ait DOS ve serum bulguları arasındaki Spearman korelasyonu sonuçları Tablo 4.10'da gösterildi.

Tablo 4.10: Başlangıç biyokimyasal parametrelerin kendi arasındaki Spearman korelasyonu

			DOS TOTAL MİKTAR				DOS KONSANTRASYON			
			ErbB4	Nrg4	IL-6	IL-10	ErbB4	Nrg4	IL-6	IL-10
DOS TOTAL MİKTAR	ErbB4	r	1.000	.622**	.290*	-.488**	.801**	.455**	-.032	-.462**
		p	.	.000	.014	.000	.000	.000	.793	.000
	Nrg4	r	.622**	1.000	.104	-.458**	.471**	.844**	-.087	-.397**
		p	.000	.	.379	.000	.000	.000	.469	.001
	IL-6	r	.290*	.104	1.000	-.338**	.227	.045	.416**	-.291*
		p	.014	.379	.	.004	.051	.705	.000	.014
	IL-10	r	-.488**	-.458**	-.338**	1.000	-.353**	-.377**	-.044	.799**
		p	.000	.000	.004	.	.002	.001	.718	.000
	IL-6/IL-10	r	.518**	.349**	.678**	-.847**	.411**	.269*	.287*	-.739**
		p	.000	.003	.000	.000	.000	.027	.015	.000
DOS KONSANTRASYON	ErbB4	r	.801**	.471**	.227	-.353**	1.000	.592**	.316**	-.200
		p	.000	.000	.051	.002	.	.000	.007	.092
	Nrg4	r	.455**	.844**	.045	-.377**	.592**	1.000	.129	-.241*
		p	.000	.000	.705	.001	.000	.	.288	.046
	IL-6	r	-.032	-.087	.416**	-.044	.316**	.129	1.000	.176
		p	.793	.469	.000	.718	.007	.288	.	.145
	IL-10	r	-.462**	-.397**	-.291*	.799**	-.200	-.241*	.176	1.000
		p	.000	.001	.014	.000	.092	.046	.145	.

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$.

(DOS: Diş Eti Oluğu Sıvısı, ErbB4: Erb-b2 reseptör tirozin kinaz 4, Nrg4: Neuregulin 4, IL: İnterlökin)

Tablo 4.10 (devamı): Başlangıç biyokimyasal parametrelerin kendi arasındaki Spearman korelasyonu

			SERUM KONSANTRASYON			
			ErbB4	Nrg4	NOS2	Arg1
DOS TOTAL MİKTAR	ErbB4	<i>r</i>	.140	-.012	.161	-.176
		<i>p</i>	.237	.923	.188	.161
	Nrg4	<i>r</i>	.064	-.100	.134	-.133
		<i>p</i>	.582	.409	.270	.276
	IL-6	<i>r</i>	.167	.177	.228	-.022
		<i>p</i>	.148	.145	.058	.859
	IL-10	<i>r</i>	-.247*	-.019	-.131	.186
		<i>p</i>	.034	.882	.287	.134
	IL-6/IL-10	<i>r</i>	.278*	.101	.259*	-.133
		<i>p</i>	.019	.425	.038	.294
DOS KONSANTRASYON	ErbB4	<i>r</i>	.127	.074	.117	-.098
		<i>p</i>	.273	.545	.336	.429
	Nrg4	<i>r</i>	.058	.061	.225	-.115
		<i>p</i>	.624	.619	.066	.355
	IL-6	<i>r</i>	.076	.158	.055	.196
		<i>p</i>	.519	.202	.657	.111
	IL-10	<i>r</i>	-.204	.003	-.123	.167
		<i>p</i>	.084	.981	.321	.180
	ErbB4	<i>r</i>	1.000	.413**	.232	.212
		<i>p</i>	.	.000	.050	.078
SERUM KONSANTRASYON	Nrg4	<i>r</i>	.413**	1.000	.171	.270*
		<i>p</i>	.000	.	.174	.029
	NOS2	<i>r</i>	.232	.171	1.000	.071
		<i>p</i>	.050	.174	.	.575
	Arg1	<i>r</i>	.212	.270*	.071	1.000
		<i>p</i>	.078	.029	.575	.

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$.

(DOS: Diş Eti Oluğu Sıvısı, ErbB4: Erb-b2 reseptör tirozin kinaz 4, Nrg4: Neuregulin 4, IL: İnterlökin, NOS2: Nitrik Oksit Sentaz 2, Arg1: Arjinaz 1)

Korelasyon sonuçlarına bakıldığında,

1. DOS ErbB4 total miktarı ile; Nrg4 total miktarı arasında pozitif güçlü korelasyon; DOS Nrg4 konsantrasyonu arasında pozitif orta düzeyde korelasyon; DOS IL-6 total miktarı arasında pozitif zayıf korelasyon; DOS IL-10 seviyeleri (total miktar ve konsantrasyon) arasında ise negatif orta düzeyde korelasyon,
2. DOS Nrg4 total miktarı ile; DOS ErbB4 konsantrasyonu arasında pozitif orta düzeyde korelasyon; DOS IL-10 seviyeleri (total miktar ve konsantrasyon) arasında ise negatif orta düzeyde korelasyon,
3. DOS IL-6 total miktarı ile DOS IL-10 seviyeleri (total miktar ve konsantrasyon) arasında negatif zayıf korelasyon,

4. DOS IL-6/IL-10 oranı ile;DOS ErbB4 total miktarı arasında pozitif orta düzeyde korelasyon; DOS Nrg4 total miktarı ve serum NOS2 konsantrasyonu arasında zayıf pozitif korelasyon;
5. DOS ErbB4 konsantrasyonu ile; DOS Nrg4 konsantrasyonu arasında pozitif güçlü korelasyon; DOS IL-6 konsantrasyonu arasında pozitif zayıf korelasyon,
6. DOS Nrg4 konsantrasyonu ile IL-10 konsantrasyonu arasında negatif zayıf korelasyon,
7. Serum ErbB4 konsantrasyonu ile; serum Nrg4 konsantrasyonu arasında pozitif orta düzeyde korelasyon; IL-10 DOS total miktarı arasında ise negatif zayıf korelasyon,
8. Serum Nrg4 konsantrasyonu ile serum Arg1 konsantrasyonu arasında pozitif zayıf korelasyon olduğu bulundu.

5. TARTIŞMA

Bilgilerimiz dahilinde, bu çalışma periodontal hastalık ve sağlıkta DOS ile serum ErbB4 ve Nrg4 seviyelerini değerlendiren ilk çalışmadır. Periodontal enflamasyon varlığında artan DOS ErbB4 ve Nrg4 total miktarlarının cerrahi olmayan periodontal tedavi sonrası ise azalması bu belirteçlerin periodontal hastalık patogenezinde rolü olabileceğine işaret etmektedir.

Çalışmaya dahil edilen bireylerin seçiminde, mevcut periodontal durum üzerinde etkili olduğu bilinen yaş ve cinsiyet parametrelerinin gruplar arasında büyük farklılıklar göstermemesine özen gösterilmekle birlikte, periodontitisin doğası gereği çoğunlukla ileri yaşlarda görülmesi (159) nedeniyle periodontitis gruplarının yaş ortalamaları diğer gruplardan daha yüksekti. Diğer taraftan cinsiyet dağılımı açısından gruplar arasında fark yoktu.

Diş eti oluk sızıntısı ve serumda analiz edilen biyolojik belirteç seviyelerinin sistemik hastalık varlığı, hamilelik, emzirme, sigara kullanımı, antibakteriyel ve antienflamatuar ilaç kullanımı gibi çeşitli faktörlerden etkilendiği bilinmektedir (160–165). Ayrıca, yapılan çalışmalarda obez bireylerde serum Nrg4 seviyelerinde değişiklik olduğu bildirilmiştir (144). Tüm bu bilgiler doğrultusunda, çalışmaya başlamadan önce dahil edilme ve çıkarılma kriterleri belirlenerek incelenen sitokin düzeylerini etkileyebilecek sistemik hastalık/durumları içeren bireyler çalışma dışı bırakıldı. Sigara kullanmayan ve/veya hafif içici bireyler çalışmaya dahil edildi. Çalışmamızda günde 10 adetten az sigara içen bireylerin gruplar arasındaki dağılımları benzerdi.

Periodontal hastalıklarda lokal yıkım alanında bulunma ve kolay, atravmatik ve tekrarlanabilir bir şekilde toplanabilme gibi avantajları (166) nedeniyle bu çalışmada DOS'taki sitokin düzeylerinin incelenmesi tercih edildi. Lokal enflamatuar yanıt sonucu gelişen periodontal hastalıklarda bakteri ve/veya ürünlerinin konak immün hücrelerini aşarak enflame periodontal dokulardan sistemik dolaşıma geçebildiği ve periferik kan hücrelerinden proenflamatuar sitokin salınımını uyurabildiği bildirildiğinden (167); çalışma gruplarımızda yer alan bireylere ait

serum örneklerindeki sitokin düzeyleri de analiz edildi. Diş eti oluğu sıvısı ve serum örnekleri sağlıklı grupta yalnızca çalışma başlangıcında alındı. Periodontal hastalıklı bireylerde (G, P1 ve P2 grupları) ise cerrahi olmayan periodontal tedavi sonrası 1. ayda DOS ve serum örneklemeleri tekrarlandı. Literatürde periodontal hastalıklı bireylerden elde edilen biyolojik sıvılarda başlangıç sitokin seviyelerinin cerrahi olmayan periodontal tedavi sonrası 1. ay (168), 6. hafta (169), 3. veya 6. aydaki (170) değişimlerinin değerlendirildiği çalışmalar bulunmakla birlikte, birinci aydaki değerlendirme klinik iyileşmenin gerçekleşmesi için yeterli bir süre olduğundan bu çalışmada klinik ve biyokimyasal parametreler cerrahi olmayan periodontal tedaviden 1 ay sonra yeniden değerlendirildi. Böylece çalışmamızda, değerlendirilen sitokinlerin farklı periodontal hastalık gruplarındaki seviyelerinin yanında tedavi sonrası enflamasyonun çözülmesi sonrası bu seviyelerdeki değişimler de belirlendi.

Periodontal dokulardaki enflamasyonun ve bu enflamasyona bağlı gelişen doku yıkımının değerlendirilmesinde çeşitli periodontal klinik ölçümler kullanılmaktadır (171). Çalışmamıza dahil edilen bireylerin mevcut periodontal durumlarını ve periodontal hastalıklı bireylere uygulanan cerrahi olmayan periodontal tedavinin etkinliğini objektif bir şekilde değerlendirebilmek amacı ile tüm ağız ve örnek alınan diş bölgelerine ait Pİ, Gİ, PKİ, SK, SD ve KAK ölçümleri kaydedildi. Değerlendirilen periodontal klinik parametrelerin tümü beklenildiği gibi periodontal hastalıklı bireylerde sağlıklı bireylere göre daha yüksekti. İlave olarak, cerrahi olmayan periodontal tedavi uygulanan gruplarda tedavi sonrası 1. ayda yapılan ölçümlerde tüm klinik parametrelerde azalma olduğu belirlendi.

Klinik parametrelerin ölçülmesi sırasında mekanik travmaya ve/veya enflamasyona bağlı diş etinde kanama oluşabilmesi sebebiyle, DOS örnekleri klinik ölçümler yapıldıktan en az 1 gün sonra alındı (172). Literatürde DOS örneklerinin toplanmasında kapiller tüp yöntemi (173), diş eti oluğu yıkama yöntemi (174–176) ve kağıt şerit yöntemi (174,177,178) gibi birçok farklı teknik tanımlanmıştır. Bu çalışmada DOS örneklemeleri için hızlı, uygulaması kolay ve doğru uygulandığı takdirde en az travmatik yöntem olan kağıt şeritler ile örnekleme yöntemi tercih edildi. Örnekleme kağıt şeritler 1-2 mm'den fazla olmayacak şekilde diş eti oluğu/periodontal cep girişine yerleştirilerek modifiye intrasulküler yöntem ile yapıldı (158). Bölgede DOS akışında artışa yol açacak şekilde bir irritasyon

yaratmadan yeterli miktarda örnek toplanmasına olanak sağladığından örnekleme süresi 30 sn olarak belirlendi (172).

Diş eti oluk sıvısı miktarı ve içeriğinin periodontal doku sağlık durumundan etkilendiği bilinmektedir (179,180). Bu nedenle DOS değerlendirilen çalışmalarda kağıt şeritlere emdirilmiş DOS hacminin analiz edilmesi önemlidir. Çalışmamızda DOS hacimleri, çalışma öncesinde kalibre edilmiş Periotron 8010® cihazı ile ölçüldü ve cihazın verdiği skor bilgisayar programı vasıtasıyla µl birimine çevrildi. Literatürde DOS hacmi ile periodontal enflamasyon ve klinik periodontal parametreler arasında pozitif korelasyon olduğu (181–184) ve periodontal tedavi sonrası DOS hacminin azaldığı (185–188) bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda da periodontitisli bireylerin DOS hacimleri sağlıklı bireylerden yüksekti. Gingivitis grubunun DOS hacmi sağlıklı gruptan fazla olmakla birlikte bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Evre III periodontitisli bireylerde cerrahi olmayan periodontal tedavi sonrası 1. ayda DOS hacminin azaldığı tespit edildi. Gingivitis ve evre II periodontitis gruplarının DOS hacimlerinde tedavi sonrası görülen azalmalar ise anlamlı değildi. Bu sonuçlar DOS hacminin sigara kullanımı (189), sirkadyen ritim (190), kullanılan DOS elde etme yöntemi ve bulunulan ortamın ısısı/nemi gibi birçok faktörden etkilenmesi (191) ile açıklanabilir.

Diş eti oluk sıvısındaki biyokimyasal belirteç seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan analiz yöntemi büyük önem taşımaktadır. Diş eti oluk sıvısı içeriğinin tespitinde kullanılacak yöntemin çok küçük hacimlerde çok az miktarda bulunan mediyatörleri saptayabilecek hassasiyete sahip olması gerekmektedir (50). Bu amaçla *time-resolved immuno fluorometric assay* (TR-IFMA) (192), *multiplexed bead immunoassay* (MPBI) (193), polimeraz zincir reaksiyonu (*polymerase chain reaction*, PCR) (194), yüksek performanslı sıvı kromatografisi (*high performance liquid chromatography*, HPLC) (195), flow sitometri (196) yöntemleri kullanılmakla birlikte ELISA yöntemi pratik ve ucuz olması nedeniyle DOS'un incelendiği çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır (197). Bu çalışmada da DOS ve serum örnekleri ELISA ile analiz edildi.

Diş eti oluk sıvısı verilerinin birim hacimdeki değeri olan konsantrasyon yerine standartlaştırılmış örnekleme süresi başına toplam miktar olarak ifade

edilmesi daha hassas bir yoldur. DOS konsantrasyonu doğrudan DOS hacminden etkilenmekte ve DOS konsantrasyonundaki değişim değerlendirilen belirteç düzeyindeki gerçek değişimi yansıtamayabilmektedir (198). Bu nedenle bu çalışmanın sonuçları DOS konsantrasyonundan ziyade DOS total miktarı üzerinden tartışıldı.

Mikrobiyal saldırıya karşı gelişen ilk akut cevabın uygun şekilde sonlandırılması veya makrofaj aktivitesinin enflamatuvar fenotipten onarım fenotiplerine kaydırılmasındaki başarısızlık kronik enflamasyon gelişimine katkıda bulunabilir (199–201). Aktif makrofajların proenflamatuvar kapasitesini kısıtlayan veya proenflamatuvar popülasyonları ortadan kaldıran mekanizmaların tanımlanmasının, birçok kronik enflamatuvar hastalığın kontrolünde yeni terapötik müdahalelere ışık tutabileceği bildirilmiştir (25). Tüm bu bilgiler araştırmacıları M1/M2 dengesinin düzenlenmesinde rol oynayan sinyal yolları ve reseptör-ligand etkileşimlerini incelemeye yöneltmiştir. Schumacher ve ark. (25), enflamatuvar bağırsak hastalığında Nrg4 ve reseptörü ErbB4'ün ekspresyonunun arttığını ve ErbB4-Nrg4 etkileşiminin M1 makrofajların mitokondriyal apoptozunu indüklediğini rapor etmişlerdir. Aktif enflamasyon aşamasında makrofajların toplanma süresi boyunca Nrg4 ekspresyonunun baskılanarak enflamasyonun devam etmesinin sağlandığı; iyileşme fazında ise artan Nrg4 ekspresyonunun M1 makrofaj apoptozunu indüklemesi sonucu M1/M2 dengesini M2 yönüne çevirdiği belirtilmiştir. Enflamasyonun farklı aşamalarında Nrg4 ekspresyonunda görülen bu değişiklikler, proenflamatuvar sitokinlerin adipositlerde (128) ve bağırsakta (202,203) Nrg4 ekspresyonunu inhibe edebileceği ve TNF ile Nrg4 arasında önemli bir negatif korelasyon olduğu (25) sonuçları ile ilişkilendirilmiştir. Aynı çalışmacılar deneysel kolit oluşturulan farelerde ekzojen Nrg4 uygulamasının ise makrofaj sayılarını azaltarak enflamasyonunun çözünmesine katkı sağladığını bildirmişler ve ErbB4-Nrg4 etkileşiminin antienflamatuvar role sahip olabileceğini ileri sürmüşlerdir (25). Ma ve ark. (26) ise farelerde yaptıkları bir çalışmada, Nrg4'ün aşırı ekspresyonunun makrofaj belirteci MCP-1 gen ekspresyonunu inhibe ederek ve M2 makrofaj belirteç geni CD163 ekspresyonunu arttırarak yüksek yağlı diyetle bağlı gelişen kronik enflamasyonu azaltabileceğini rapor etmişlerdir.

Yapılan çalışmalarda bir adipokin olan Nrg4'ün glikoz ve lipid metabolizmasını düzenlemede ve kronik enflamasyonu azaltmada kilit bir rol oynadığı; Nrg4 seviyelerindeki değişikliklerin obezite, insülin direnci, hiperglisemi, dislipidemi, oksidatif stres ve enflamasyona katkıda bulunduğu bildirilmiştir (128–130,132,144,146,204–206). Tip 2 diyabetes mellitus (T2DM) hastalarında yapılan çalışmalarda plazma/serum Nrg4 seviyelerinin azaldığı tespit edilmiş ve Nrg4'ün T2DM patogenezinde önemli bir rolü olabileceği belirtilmiştir (207,208). Yan ve ark. (130) T2DM hastalarında MetS varlığı ile Nrg4 seviyeleri arasındaki ilişkiyi inceledikleri çalışmalarında, MetS olan diyabet hastalarında daha düşük plazma Nrg4 düzeyleri saptamışlardır. İlave olarak, hsCRP ve beyaz kan hücre sayısının plazma Nrg4 seviyesi ile bağımsız ilişkili olduğunu ve aralarında negatif korelasyon bulunduğunu bildirmişlerdir. Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı olan kişilerde serum Nrg4 konsantrasyonlarının azaldığını gösteren bir çalışmada da Nrg4'ün metabolik hastalıkların gelişimini önleyici bir faktör olabileceği öne sürülmüştür (209). Wang ve ark. (128), obez farelerin adipoz dokularında Nrg4 mRNA ekspresyonunun azaldığını, insanlarda da karaciğer yağ içeriği ve vücut yağ kütlesi yüzdesi ile Nrg4 mRNA ekspresyonu arasında ters yönlü korelasyon bulunduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmaların aksine, pre-diyabetik veya diyabetik kişilerde dolaşımdaki Nrg4 seviyelerinde artış olduğunu gösteren ve serum Nrg4 düzeyini diyabet gelişimi için bağımsız bir risk faktörü olarak rapor eden çalışmalar da bulunmaktadır (145,147). Zhang ve ark. (210)'nın yaptıkları hayvan çalışmasında obez veya diyabetik kemirgenlerde karaciğer Nrg4 mRNA seviyelerinde önemli bir artış olduğu; karaciğer Nrg4 ekspresyon seviyesi ile diyabet riski arasında pozitif yönlü bir ilişki bulunduğu rapor edilmiştir. Araştırmacılar, bulgular arasındaki tutarsızlıkların çalışma popülasyonlarındaki metabolik koşulların veya çalışma tasarımlarının farklılığından kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir (211). Çalışma sonuçlarındaki bu farklılıklar Nrg4'ün farklı patolojik durumlar altında dokuya spesifik bir ekspresyon paternine sahip olabileceğini göstermektedir. İlave olarak, Nrg4'ün tüm metabolik özelliklerinin otokrin ve parakrin etkilerinden çok endokrin fonksiyonu ile ilişkilendirildiği (131,142,212), lokal veya sistemik metabolizmada yer alan diğer dokulardaki etkileri hakkında henüz hiçbir şey bilinmediği vurgulanmıştır (210).

Bu bilgiler ışığında bizim çalışmamızda periodontal hastalıkta M1/M2 dengesinin sağlanmasında ErbB4-Nrg4 etkileşiminin rolü değerlendirildi. Mevcut literatür bilgilerimize göre bu çalışma, DOS'ta ErbB4 ve Nrg4 seviyelerinin analiz edildiği ilk çalışmadır. Periodontal hastalık gruplarında artmış olan DOS ErbB4 ve Nrg4 total miktarlarının cerrahi olmayan periodontal tedavi sonrası enflamasyonun çözülmesini takiben düşüş göstermelerinin yanında, periodontal enflamasyon varlığının göstergesi olan tüm klinik periodontal parametreler ile pozitif yönlü korele olmaları, bu iki sitokinin periodontal hastalık patogenezinde rolü olabileceğine işaret etmektedir. Periodontal hastalıkta DOS ErbB4 ve Nrg4 düzeylerindeki artış, akut enflamatuvar yanıt sonrası gerekenden fazla artan ve uzayan proenflamatuvar M1 makrofaj etkilerini sınırlandırmaya çalışan bir kompanzasyon mekanizması olarak düşünülebilir. Daha önceki çalışmalarda ErbB4-Nrg4 etkileşiminin enflamasyonun çözülmesini destekleyen antienflamatuvar etkilerinin (25,26,130) yanında epitelyal sağkalımı (131,132) da desteklediğine yönelik elde edilen kanıtlar ile birlikte bizim çalışmamızın bulguları, periodontal doku hasarına yol açan periodontal hastalıklarda ErbB4-Nrg4 etkileşiminin iyileşmeyi destekleyici rolü olduğu hipotezini desteklemektedir. Periferik kanda ErbB4 ve Nrg4 seviyeleri incelendiğinde ise, başlangıç serum ErbB4 konsantrasyonunun evre III periodontitisli bireylerde sağlıklı ve evre II periodontitisli bireylere göre daha yüksek olduğu görülmekle birlikte, serum Nrg4 seviyelerindeki farklılık anlamlı bulunmadı. Periodontal hastalıklı gruplarda tedavi sonrası serum ErbB4 ve Nrg4 konsantrasyonlarında anlamlı bir değişim görülmedi. Periodontal hastalık varlığında DOS'ta ErbB4 ve Nrg4 seviyelerinde görülen değişimlerin serumda tespit edilememesi, lokal doku yıkımının olduğu alanlardaki sitokin değişimlerinin sistemik dolaşıma yansımadığını bildiren diğer çalışmalarla (68,172,213) benzerlik göstermektedir.

Sitokinler, enflamatuvar ve immün yanıtların başlatılmasında ve sürdürülmesinde önemli rol oynayan çözünebilir proteinlerdir (214). Çok işlevli bir sitokin olan IL-6, akut faz cevabı sırasındaki akut faz protein sentezinin en önemli düzenleyicisidir ve periodontal hastalıkta en çok çalışılan enflamatuvar belirteçlerden biridir (172,214). Yapılan çalışmalarda gingivitis ve kronik periodontitisli hastalarda enflame diş eti dokularında ve DOS'ta IL-6 seviyelerinin arttığı bulunmuştur (68,74,215). Lin ve ark. (79) DOS IL-6 seviyesi ile periodontitis şiddeti arasında

pozitif yönde korelasyon olduğunu belirtmişlerdir. İnatçı periodontitisli bireylerde hastalığın aktif bölgelerinde (3 ay içerisinde 2,1 mm'den fazla ataçman kaybı görülen) inaktif bölgelere göre anlamlı derecede yüksek DOS IL-6 düzeyleri tespit edilmiştir (216). Guillot ve ark. (217) ise enflamasyonun çözülmediği periodontal cerrahi tedavi gerektiren bölgelerde, cerrahi tedavi gerekmeyen bölgelere kıyasla daha düşük DOS IL-6 seviyeleri saptamışlardır. Keleş ve ark. (218) da sağlıklı bireylere kıyasla gingivitisli ve periodontitisli bireylerde IL-6 DOS total miktarı ve serum konsantrasyonunun daha yüksek olduğunu, gingivitis ve kronik periodontitisli bireyler arasında ise DOS IL-6 düzeylerinde anlamlı bir fark olmadığını bildirmiştir. Kronik periodontitisli hastalarda DOS IL-6 düzeyinin incelendiği bir çalışmada sağlıklı bölgeler ile hastalıklı bölgeler arasında DOS IL-6 total miktarı açısından anlamlı fark görülmediği ve tedavi sonrası 6. ve 16. haftalarda DOS IL-6 miktarında hafif bir azalma olduğu bildirilmiştir (219). Bozkurt ve ark. (58) da erişkin periodontitisli hastalarda DOS IL-6 düzeyleri ile klinik parametreler arasında bir ilişki bulunmadığını öne sürmüşlerdir. Bizim çalışmamızda sağlıklı ve periodontal hastalıklı gruplar arasında DOS IL-6 total miktarı açısından fark olmadığı ve tedavi sonrası DOS IL-6 seviyelerinde anlamlı bir değişiklik olmadığı görüldü. Ayrıca, DOS IL-6 düzeyi ile periodontal klinik parametreler arasında anlamlı bir korelasyon tespit edilmedi. Hastalık şiddeti ve enflamatuvar durumun DOS IL-6 total miktarını anlamlı derecede etkilememiş olması, IL-6'nın hem proenflamatuvar (65) hem antienflamatuvar (63,64) etkileri olan çok yönlü bir sitokin olması ile ilişkili olabilir. Periodontal tedavi sonrası klinik iyileşme görülmekle birlikte periodontal dokularda subklinik enflamasyon devam ediyor olabilir. Bu durum bireyler arasındaki iyileşme potansiyelinin farklı olmasından kaynaklanabileceği gibi mikrobiyal dental plak kompozisyonunun farklı olmasından da kaynaklanabilir (220,221)

Çok yönlü sitokinlerden biri olan IL-10'un özellikle monosit kaynaklı proenflamatuvar sitokinlerin üretiminin azaltılması ve koruyucu antikor üretiminin uyarılmasıyla yoluyla periodontitiste rol oynadığı düşünülmektedir (92,222). İmmün regülasyonda IL-10 seviyelerinin kritik öneme sahip olduğu, doğal enflamatuvar yanıt ve edinilmiş humoral cevaplar arasındaki dengeyi kontrol ettiği öne sürülmüştür (94). Gemell ve Seymour (93) tarafından yapılan bir çalışmada, yetişkin periodontitis lezyonlarında (KAK>5 mm) KAK<4 mm olan gruba kıyasla düşük miktarda

gingival IL-10 + CD8 hücresi tespit edilmiştir. İlave olarak, yüksek IL-10 + T hücre yüzdesi varlığının stabil bir lezyonu gösterebileceğini, düşük IL-10 + T hücre yüzdesinin ise ilerleyici bir lezyonu işaret edebileceğini öne sürmüşlerdir. Yamazaki ve ark. (94) da diş eti dokularında IL-10 ekspresyonunun periodontitis grubunda (KAK 4.8 ± 1.5 mm) kontrol grubundan (KAK 2.0 ± 0.3 mm) daha düşük olduğunu ortaya koymuştur. Passoja ve ark. (95), minimal enflamasyonlu periodontal dokulara sahip kontrol grubunda periodontitis grubundan daha yüksek serum IL-10 konsantrasyonu tespit etmişlerdir. Goutoudi ve diğ. (223) ise periodontal hastalıklı bireylerin sağlıklı ve hastalıklı bölgelerinde DOS IL-10 total miktarlarının benzer olduğunu ve 32 haftalık takip süresi boyunca neredeyse değişmeden kaldığını bildirmişlerdir. Diğer yandan, enflame doku biyopsilerinde IL-4 ve IL-10 oranlarının yüksek olduğu gösteren ve IL-10'u periodontitis hastalarının gingival dokularında gözlenen baskın bir sitokin profili olarak bildiren çalışmalar da mevcuttur (224). Bizim çalışmamızda ise başlangıç DOS IL-10 seviyelerinin sağlıklı grupta diğer gruplardan daha yüksek olduğu ve örnek alınan diş bölgelerine ait tüm periodontal klinik parametreler ile negatif yönlü korele olduğu tespit edildi. Ayrıca periodontal tedavi sonrası gingivitis ve evre III periodontitisli bireylerde DOS IL-10 seviyelerinin anlamlı derecede arttığı saptandı. Periodontal hastalık varlığında azalan ve periodontal tedavi sonrası artış gösteren DOS IL-10 düzeyleri, enflamasyon varlığında azalan antienflamatuvar mekanizma ile açıklanabilir.

Periodontal hastalık patogenezinde M1/M2 dengesinin araştırıldığı bir çalışmada periodontitiste serum IL-6/IL-10 oranının arttığı ve bu durumun M2'den M1'e doğru gerçekleşen fenotipik kaymayı işaret ettiği bildirilmiştir (21). Bu çalışmada da periodontal hastalıklı gruplarda DOS IL-6/IL-10 oranının sağlıklı gruptan fazla olduğu saptandı. Ek olarak, DOS IL-6/IL-10 oranı ile PKİ, SK, SD ve KAK değerleri arasında pozitif yönlü korelasyon olduğu belirlendi. Gingivitisli ve periodontitisli hastalarda periodontal tedavi sonrası IL-6/IL-10 oranının azaldığı tespit edilmekle birlikte; evre II periodontitisli hastalardaki değişim anlamlı değildi. Bu sonuçlar hastalık patogenezinde sitokinlerin tek başına değerlendirilmesinden ziyade proenflamatuvar-antienflamatuvar sitokin dengesinin/oranının değerlendirilmesinin daha önemli ve anlamlı olabileceğine işaret etmektedir. Enflamasyon varlığında proenflamatuvar mekanizmanın (M1 makrofaj yanıtı), enflamasyonun çözülme

aşamasında ise antienflamatuar mekanizmanın (M2 makrofaj yanıtı) etkin olduğunu göstermektedir.

Literatürde M1/M2 dengesi ile NOS2-Arg1 enzim dengesi arasındaki ilişkiye de dikkat çekilmiştir (20). Nitrik oksit sentaz-2 enzimi M1 makrofaj metabolik belirteci olarak tanımlanırken Arg1 enzimi ise M2 makrofaj metabolik belirteci olarak tanımlanmıştır (15). M1 makrofajlar proenflamatuar sitokinler TNF- α , IL-1 β ve IL-6 ile yüksek düzeyde NOS2 üretir. Antienflamatuar M2 makrofajlar ise IL-10, CD206 (hücre yüzeyi belirteci) ve yüksek seviyede Arg1 eksprese eder (15,225). Nitrik oksit sentaz-2 enzimi neredeyse yalnızca enflamatuar uyaranlara yanıt olarak makrofaj, nötrofil, fibroblast ve epitelial hücreler gibi çeşitli hücrelerden eksprese edilir (226). Bu enzimin arginini yıkması sonucu bakterilerin öldürülmesi ve enflamasyonun başlatılmasında görev alan nitrik oksit (NO) oluşur. Aynı substrat için yarışan Arg1 enziminin arjinini parçalaması sonucu oluşan poliaminler ve prolin ise doku proliferasyonu ve tamirinde rol oynar (20). Bu özelliklerinden dolayı M1 makrofajlar NOS2 enzim aktivitesi ile, M2 makrofajlar ise Arg1 enzim aktivitesi ile ilişkilendirilmiştir (20). Bu verilerden yola çıkılarak bu çalışmada, periodontal hastalık-M1/M2 dengesi ilişkisini daha iyi aydınlatabilmek için serum NOS2 ve Arg1 seviyeleri incelendi.

Daha önce yapılan hayvan çalışmalarında periodontitis modellerinde sağlıklı kontrollere kıyasla daha yüksek diş eti NOS2 seviyeleri bulunmuştur (227–229). Dahası, gingivitis (230) ve kronik periodontitiste (101,105,230–235) insan diş eti dokularında NOS2 ekspresyonunun enflamasyona paralel olarak arttığı bildirilmiştir. Periodontal hastalıkta M1/M2 dengesini inceleyen bir çalışmada, periodontitisli farelerin periodonsiyumunda NOS2/CD206 (M2 makrofaj belirteci) oranının periodontitiste M1 fenotipinin baskın olduğunu destekler şekilde arttığı gösterilmiştir (21). Aynı çalışmada periodontitisli farelerin periodonsiyumunda Arg1 seviyesinin de arttığı bildirilmiştir. Periodontal hastalıkta tükürük arjinaz aktivitesini inceleyen bir çalışmada, periodontitis hastalarında tükürük arjinaz aktivitesinin sağlıklı bireylere göre yüksek olduğu ve cerrahi olmayan periodontal tedavi sonrası ise azaldığı belirtilmiştir (104). Diğer yandan, Özer ve ark. (236) 'nın periodontal sağlık, gingivitis ve kronik periodontitis gruplarında tükürük ve diş eti arjinaz seviyelerini karşılaştırdıkları çalışmalarında, en yüksek arjinaz seviyesinin gingivitiste, en düşük

arjinaz seviyesinin ise periodontitiste görüldüğü bildirilmiştir. Yine aynı çalışmada, periodontal tedavi sonrası gingivitis ve periodontitis gruplarında diş eti NOS2 ekspresyonunun azaldığı, arjinaz seviyelerinin ise arttığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlarla uyumlu olarak Güllü ve ark. (105) da kronik periodontitisli bireylerde cerrahi ve cerrahi olmayan periodontal tedavi sonrası diş eti arjinaz aktivitesinin arttığını ve NOS2 ekspresyonunun azaldığını rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda periodontal hastalık gruplarına kıyasla sağlıklı grupta serum NOS2 seviyesinin daha düşük olduğu, serum Arg1 düzeyinin ise daha yüksek olduğu belirlendi. İlave olarak, serum NOS2 düzeyi ile tüm ağız Pİ, Gİ, SK, SD ve KAK değerleri arasında pozitif yönlü korelasyon olduğu, serum Arg1 konsantrasyonu ile Gİ arasında ise negatif yönlü korelasyon olduğu saptandı. Tedavi sonrası verileri incelendiğinde, gingivitis ve evre III periodontitis gruplarında serum NOS2 düzeyinin anlamlı derecede azaldığı bulundu. Periodontal tedavi sonrası serum Arg1 seviyelerindeki artış ise anlamlı değildi. Bu bulgular periodontal hastalıkta NOS2 aktivitesinin arttığına, Arg1 aktivitesinin ise azaldığına işaret etmektedir. Periodontal hastalıkta artmış serum NOS2 seviyesi, bakterileri öldürme görevinin yanında metalloproteinazların ve osteoklastların sinyal yollarını aktive ederek periodontal doku hasarına neden olan NO seviyesinin yükselmesiyle ilişkili olabilir (237). Arjinazın ortak substrat arjinin için NOS ile yarıştığı ve böylece NO üretimini kontrol ettiği bilinmektedir. Bu nedenle periodontal hastalık durumlarında NO üretiminin artmasının ana nedenlerinden biri arginaz aktivitesindeki düşüş gibi görünmektedir. Diğer yandan, enflamatuar durumlar ve patojen mikroorganizmalara yanıt olarak artan NO üretimi arjinaz aktivitesinde azalmaya yol açmış olabilir (105,238,239). Bununla birlikte, diş eti ile karşılaştırıldığında tükürük ve serum enflamatuar yanıtın başladığı periodontal dokulara daha uzaktırlar. Ayrıca tükürük ve serum içerikleri oldukça komplekstir ve bileşenlerindeki enzimlerin veya proteinlerin kaynaklarının tam olarak belirlenebilmesi, doku numunelerine kıyasla çok daha zordur (104,240). Bu nedenle bu çalışmada serum NOS2 ve Arg1 seviyeleri çeşitli içsel veya dışsal faktörlerden etkilenmiş olabilir.

Bu çalışmanın limitasyonları arasında Arg1 yerine CD206 (21) gibi daha spesifik bir M2 makrofaj belirtecinin ve diş eti dokusu sitokin seviyelerinin değerlendirilmemiş olması sayılabilir. Ayrıca periodontal dokularda ErbB4 ve Nrg4

gen ekspresyonunun incelenmemiş olması da erken dönem değişimlerin değerlendirilmesini sınırlamış olabilir. Çalışmanın nispeten küçük örneklem büyüklüğüne sahip olması da limitasyonlarından biri olmakla birlikte, yapılan güç analizine göre örneklem büyüklüğü gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit etmek için yeterliydi. Ek olarak, çalışma dizaynımız split-mouth olmadığından çalışma sonuçları bireylerin monositik cevaplarındaki farklılıklardan etkilenmiş olabilir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda periodontal olarak sağlıklı, gingivitisli, evre II ve evre III periodontitisli bireylerden alınan DOS örneklerindeki ErbB4, Nrg4, IL-6 ve IL-10 seviyeleri ve serum örneklerindeki ErbB4, Nrg4, NOS2 ve Arg1 konsantrasyonları değerlendirildi. Gingivitisli ve periodontitisli bireylere uygulanan cerrahi olmayan periodontal tedavi sonrası bu sitokinlerin başlangıç seviyelerine göre değişimleri incelendi. Biyokimyasal bulguların klinik parametrelerle ilişkisi ortaya kondu. Elde edilen verilere göre;

1. Tüm ağız periodontal klinik parametreler periodontal hastalıklı bireylerde sağlıklı bireylere göre daha yüksekti. Cerrahi olmayan periodontal tedavi uygulanan gruplarda 1. ayda yapılan ölçümlerde tüm klinik parametrelerde azalma olduğu belirlendi.
2. Periodontal hastalıklı bireylerde örnek alınan bölgelere ait periodontal klinik parametreler sağlıklı bireylerden daha yüksekti. Cerrahi olmayan periodontal tedavi uygulanan hastalarda 1. ayda örnek alınan bölgelere ait tüm klinik parametrelerin azaldığı tespit edildi.
3. Periodontitisli bireylerin DOS hacimlerinin sağlıklı bireylerden yüksek olduğu, periodontal tedavi sonrası 1. ayda evre III periodontitisli bireylerde DOS hacminin azaldığı saptandı.
4. Periodontal hastalıkta DOS ErbB4 ve Nrg4 düzeylerinin artış gösterdiği belirlendi. Cerrahi olmayan periodontal tedavi sonrası 1. ayda ise DOS ErbB4 ve Nrg4 total miktarlarının azaldığı tespit edildi.
5. Diş eti oluk sıvısı IL-6 total miktarı açısından gruplar arasında farklılık görülmezken, DOS IL-10 total miktarının periodontal hastalıklı bireylerde sağlıklı bireylerden daha düşük olduğu belirlendi.
6. Periodontal hastalık gruplarında sağlıklı gruptan daha yüksek olan DOS IL-6/IL-10 oranının periodontal tedavi sonrası gingivitis ve evre III periodontitis gruplarında azaldığı tespit edildi.

7. Serum ErbB4 konsantrasyonunun P2 grubunda S ve P1 grubuna göre daha yüksek olduğu görülmekle birlikte serum Nrg4 seviyeleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılık yoktu. Periodontal hastalıklı gruplarda tedavi sonrası serum ErbB4 ve Nrg4 düzeylerinde anlamlı bir değişim görülmedi.
8. Serum NOS2 konsantrasyonu sağlıklı bireylerde periodontal hastalıklı bireylerden daha düşük iken, serum Arg1 konsantrasyonu sağlıklı bireylerde daha yüksekti. Gingivitis ve evre III periodontitisli bireylerde periodontal tedavi sonrası serum NOS2 konsantrasyonunun azaldığı saptandı.
9. Çalışma genelinde DOS ErbB4 ve Nrg4 seviyeleri ile örnek alınan dişlere ait tüm klinik periodontal parametreler arasında pozitif yönlü korelasyon olduğu belirlendi.
10. Çalışma genelinde DOS IL-10 total miktarı ile örnek alınan diş bölgelerine ait tüm periodontal klinik parametreler arasında negatif yönlü korelasyon olduğu, DOS IL-6/IL-10 oranı ile PKİ, SK, SD ve KAK değerleri arasında ise pozitif yönlü korelasyon olduğu saptandı.
11. Serum ErbB4 konsantrasyonu ile tüm ağız SK arasında pozitif yönlü korelasyon mevcuttu.
12. Serum NOS2 düzeyi ile tüm ağız Pİ, Gİ, SK, SD ve KAK değerleri arasında pozitif yönlü korelasyon olduğu tespit edilirken, serum Arg1 konsantrasyonu ile Gİ arasında negatif yönlü korelasyon olduğu belirlendi.
13. Diş eti oluk sıvısı ErbB4 total miktarı ile Nrg4 ve IL-6 total miktarları arasında pozitif yönlü korelasyon, IL-10 total miktarı arasında ise negatif yönlü korelasyon olduğu saptandı. Ayrıca DOS ErbB4 total miktarı DOS IL-6/IL-10 oranı ile pozitif korele idi.
14. Diş eti oluk sıvısı Nrg4 total miktarı ile IL-10 total miktarları arasında negatif yönlü korelasyon olduğu görülürken, DOS IL-6/IL-10 oranı ile arasında pozitif yönlü korelasyon mevcuttu.

Bu çalışmanın sınırları dahilinde, periodontal hastalıkta DOS'ta artan ve tedavi sonrası azalan, ilave olarak enflamasyon göstergeleri ile pozitif korele olan ErbB4 ve Nrg4 periodontal hastalık patogenezinde rol oynayabilen önemli birer biyobelirteç olabilir. İlave olarak, enflamasyonun çözülme aşamasında enflamatuvar makrofajların seçici inhibisyonlarında ErbB4-Nrg4 sinyal eksenini hedef alan yeni tedavi yaklaşımları ve rekombinant uygulamaları geliştirilebilir.



KAYNAKLAR

1. **Cochran DL.** Inflammation and Bone Loss in Periodontal Disease. *J Periodontol*, **2008**; 79(8): 1569-76.
2. **Löe H, Theilade E & Jensen SB.** Experimental Gingivitis in Man. *J Periodontol*. **1965**; 36: 177-87
3. **Loesche WJ & Grossman NS.** Periodontal disease as a specific, albeit chronic, infection: Diagnosis and treatment. *Clin Microbiol Rev*. **2001**; 14(4):727-52
4. **Genco RJ & Slots J.** Host Responses in Periodontal Diseases. *J Dent Res*. **1984**; 63(3): 441-51.
5. **Berglundh T & Donati M.** Aspects of adaptive host response in periodontitis. *J Clin Periodontol*. **2005**; 32(6): 87-107.
6. **Feller L, Altini M, Khammissa RA et al.** Oral mucosal immunity. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. **2013**; 116(5): 576-83.
7. **Yang J, Zhang L, Yu C, Yang XF & Wang H.** Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark Res*. **2014**; 2(1): 1.
8. **Rückerl D & Allen JE.** Macrophage proliferation, provenance, and plasticity in macroparasite infection. *Immunol Rev*. **2014**; 262(1): 113-33.
9. **Liu YC, Zou XB, Chai YF & Yao YM.** Macrophage polarization in inflammatory diseases. *Int J Biol Sci*. **2014**; 10(5): 520-9.
10. **Arango Duque G & Descoteaux A.** Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol*. **2014**; 5: 491.
11. **Fine DH, Markowitz K, Furgang D, Fairlie K et al.** Macrophage Inflammatory Protein-1 α : A Salivary Biomarker of Bone Loss in a Longitudinal Cohort Study of Children at Risk for Aggressive Periodontal Disease? *J Periodontol*. **2009**; 80(1): 106-13.
12. **Gordon S.** Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*. 2003; 3(1): 23-35.
13. **Stein M, Keshav S, Harris N. & Gordon S.** Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med*. **1992**; 176(1): 287-92
14. **Martinez FO & Gordon S.** The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep*. **2014**; 6: 13.
15. **Sima C & Glogauer M.** Macrophage subsets and osteoimmunology: tuning of the immunological recognition and effector systems that maintain alveolar bone. *Periodontol 2000*. **2013**; 63(1): 80-101
16. **Martinez FO, Gordon S, Locati M & Mantovani A.** Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol*. **2006**; 177(10): 7303-11.

17. **Biswas SK & Mantovani A.** Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature Immunology*. **2010**; 11: 889–896.
18. **Dai L, Bhargava P, Stanya KJ, Alexander RK et al.** Macrophage alternative activation confers protection against lipotoxicity-induced cell death. *Mol Metab*. **2017**; 6(10): 1186-1197.
19. **Hou Y, Yu H, Liu X, Li G et al.** Gingipain of *Porphyromonas gingivalis* manipulates M1 macrophage polarization through C5a pathway. *Vitr Cell Dev Biol Anim*. **2017**; 53(7): 593-603.
20. **Rath M, Müller I, Kropf P, Closs EI & Munder M.** Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. *Front Immunol*. **2014**; 5: 532.
21. **Yu T, Zhao L, Huang X, Ma C et al.** Enhanced Activity of the Macrophage M1/M2 Phenotypes and Phenotypic Switch to M1 in Periodontal Infection. *J Periodontol*. **2016**; 96: 234-242.
22. **Lam RS, O'Brien-Simpson NM, Lenzo JC, Holden et al.** Macrophage Depletion Abates *Porphyromonas gingivalis*-Induced Alveolar Bone Resorption in Mice. *J Immunol*. **2014**; 193(5): 2349-62.
23. **Yang J, Zhu Y, Duan D, Wang P et al.** Enhanced activity of macrophage M1/M2 phenotypes in periodontitis. *Arch Oral Biol*. **2018**; 96: 234-242
24. **Zhou LN, Bi CS, Gao LN, An Y et al.** Macrophage polarization in human gingival tissue in response to periodontal disease. *Oral Dis*. **2018**.
25. **Schumacher MA, Hedl M, Abraham C, Bernard JK et al.** ErbB4 signaling stimulates pro-inflammatory macrophage apoptosis and limits colonic inflammation. *Cell Death Dis*. **2017**; 8(2): e2622.
26. **Ma Y, Gao M & Liu D.** Preventing High Fat Diet-induced Obesity and Improving Insulin Sensitivity through Neuregulin 4 Gene Transfer. *Sci Rep*. **2016**; 6: 26242.
27. **Lang NP & Bartold PM.** Periodontal health. *J Periodontol*. **2018**; 89(1): 9-16 .
28. **Chapple ILC, Mealey BL, Van Dyke TE, Bartold PM et al.** Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol*. **2018**; 89(1): 74-84.
29. **Delima AJ, Karatzas S, Amar S & Graves DT.** Inflammation and Tissue Loss Caused by Periodontal Pathogens Is Reduced by Interleukin-1 Antagonists. *J Infect Dis*. **2002**; 186(4): 511-6.
30. **Kinane DF & Hart TC.** Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. **2003**; 14(6): 430-49.
31. **Kinane DF.** Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000*. **2001**; 25: 8-20.
32. **Williams RC.** Periodontal disease. *N Engl J Med*. 1999; *N Engl J Med*. **1990**; 322(6): 373-82.
33. **Kinane DF & Lappin DF.** Clinical, pathological and immunological aspects of periodontal disease. *Acta Odontol Scand*. **2001**; 59(3): 154-60.

34. **Hinrichs JE & Novak MJ.** Classification of Diseases and Conditions Affecting the Periodontium. In: Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR & Carranza FA. Eds. *Clinical Periodontology*, 11th Edition, China: W. B Saunders Company; **2012**: 34–54.
35. **Flemmig TF.** Periodontitis. *Ann Periodontol.* **1999**; 4(1): 32-8.
36. **Fiorellini JP, Kim DM & Uzel NG.** Gingival Inflammation. In: Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR & Carranza FA. Eds. *Clinical Periodontology*, 11th Edition, China: W. B Saunders Company; **2012**: 71-75.
37. **Caton J.** Periodontal diagnosis and diagnostic aids. In: *World Workshop in Clinical Periodontics*. Chicago: American Academy of Periodontology; **1989**: I1–I22.
38. Consensus report on diagnosis and diagnostic aids. In: *World Workshop in Clinical Periodontics*. Chicago: American Academy of Periodontology; **1989**: I23–I31.
39. *Proceedings of the 1st European Workshop on Periodontics*, 1993. London: Quintessence; **1994**.
40. **Lindhe J, Ranney R, Lamster I et al.** Consensus report: chronic periodontitis. *Ann Periodontol.* **1999**; 4:38.
41. **Lang N, Bartold P, Cullinan M et al.** Consensus report: aggressive periodontitis. *Ann Periodontol.* **1999**; 4:53.
42. **Lang N, Soslone W, Greenstein G et al.** Consensus report: necrotizing periodontal diseases. *Ann Periodontol.* **1999**; 4:78.
43. **Armitage GC.** Development of a classification system for Periodontal Disease. *Ann Periodontol.* **1999**; 4(1): 1-6.
44. **G Caton J, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC et al.** A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol.* **2018**; 45(20): 1-8.
45. **Tonetti MS, Greenwell H & Kornman KS.** Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol.* **2018**; 9(1): 159-172.
46. **Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T et al.** Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol.* **2018**; 89(1): 173-182.
47. **Hajishengallis G & Korostoff JM.** Revisiting the Page & Schroeder model: the good, the bad and the unknowns in the periodontal host response 40 years later. *Periodontol 2000.* **2017**; 75(1): 116-151.
48. **Lindhe J, Hamp S & Löe H.** Experimental periodontitis in the Beagle dog. *J. Periodontal Res.* **1973**; 8(1): 1-10.
49. **Page RC & Schroeder HE.** Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest.* **1976**; 34(3): 235-49.
50. **Preshaw PM & Taylor JJ.** Periodontal Pathogenesis. In: Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR & Carranza FA. Eds. *Clinical Periodontology*, 11th Edition, China: W. B Saunders Company; **2012**: 194-216.

51. **Seymour GJ, Powell RN & Aitken JF.** Experimental Gingivitis in Humans: A Clinical and Histologic Investigation. *J Periodontol.* **1983**; 54(9): 522-8.
52. **Amato R, Caton J, Poison A & Espeland M.** Interproximal Gingival Inflammation Related to the Conversion of a Bleeding to a Nonbleeding State. *J Periodontol.* **1986**; 57(2): 63-8.
53. **Ara T, Kurata K, Hirai K, Uchihashi T et al.** Human gingival fibroblasts are critical in sustaining inflammation in periodontal disease. *J Periodontal Res.* **2009**; 44(1): 21-7.
54. **Kawai T, Eisen-Lev R, Seki M, Eastcott JW et al.** Requirement of B7 Costimulation for Th1-Mediated Inflammatory Bone Resorption in Experimental Periodontal Disease. *J Immunol.* **2000**; 164(4): 2102-9.
55. **Lappin DF, MacLeod CP, Kerr A, Mitchell T & Kinane DF.** Anti-inflammatory cytokine IL-10 and T cell cytokine profile in periodontitis granulation tissue. *Clin Exp Immunol.* **2001**; 123(2): 294-300.
56. **Holla LI, Fassmann A, Stejskalová A, Znojil V et al.** Analysis of the Interleukin-6 Gene Promoter Polymorphisms in Czech Patients with Chronic Periodontitis. *J Periodontol.* **2004**; 75(1): 30-6.
57. **Reinhardt RA, Masada MP, Kaldahl WB, DuBois LM et al.** Gingival fluid IL-1 and IL-6 levels in refractory periodontitis. *J Clin Periodontol.* **1993**; 20(3): 225-31.
58. **Bozkurt FY, Berker E, Akkuş S & Bulut Ş.** Relationship Between Interleukin-6 Levels in Gingival Crevicular Fluid and Periodontal Status in Patients With Rheumatoid Arthritis and Adult Periodontitis. *J Periodontol.* **2000**; 71(11):1756-60.
59. **Ebersole JL & Cappelli D.** Acute-phase reactants in infections and inflammatory diseases. *Periodontol 2000.* **2000**; 23: 19-49.
60. **Taylor JJ.** Cytokine regulation of immune responses to *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol 2000.* **2010**; 54(1): 160-94.
61. **Hirano T, Matsuda T, Turner M, Miyasaka N et al.** Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol.* **1988**; 18(11): 1797-801.
62. **Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP & Hennekens CH.** Inflammation, Aspirin, and the Risk of Cardiovascular Disease in Apparently Health Men. *N Engl J Med.* **1997**; 336(14): 973-9.
63. **Schindler R, Mancilla J, Endres S, Ghorbani R et al.** Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood.* **1990**; 75(1): 40-7.
64. **Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H et al.** IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest.* **1998**; 101(2): 311-20.
65. **Jones KG, Brull DJ, Brown LC, Sian M et al.** Interleukin-6 (IL-6) and the prognosis of abdominal aortic aneurysms. *Circulation.* **2001**; 103(18): 2260-5.
66. **Howells G.** Cytokine networks in destructive periodontal disease. *Oral Dis.* **1995**; 1(4): 266-70.
67. **Graves DT & Cochran D.** The Contribution of Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor to Periodontal Tissue Destruction. *J Periodontol.* **2003**; 74(3): 391-401.

68. **Takahashi K, Takashiba S, Nagai A, Takigawa M et al.** Assessment of Interleukin-6 in the Pathogenesis of Periodontal Disease. *J Periodontol.* **1994**; 65(2): 147-53.
69. **Fujihashi K, Beagley KW, Kono Y, Aicher WK et al.** Gingival Mononuclear Cells From Chronic Inflammatory Periodontal Tissues Produce Interleukin (IL)-5 and IL-6 but Not IL-2 and IL-4. *Am J Pathol.* **1993**;142(4): 1239-50.
70. **Yamaji Y, Kubota T, Sasaguri K, Sato S et al.** Inflammatory cytokine gene expression in human periodontal ligament fibroblasts stimulated with bacterial lipopolysaccharides. *Infect Immun.* **1995**; 63(9): 3576-81.
71. **Belibasakis GN, Johansson A, Wang Y, Chen C et al.** Cytokine responses of human gingival fibroblasts to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin. *Cytokine.* **2005**; 30(2): 56-63.
72. **Patil C, Rossa C & Kirkwood KL.** *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide induces interleukin-6 expression through multiple mitogen-activated protein kinase pathways in periodontal ligament fibroblasts. *Oral Microbiol Immunol.* **2006**; 21(6): 392-8.
73. **Rogers JE, Li F, Coatney DD, Rossa C, Bronson P et al.** *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Lipopolysaccharide-Mediated Experimental Bone Loss Model for Aggressive Periodontitis. *J Periodontol.* **2007**; 78(3):550-8.
74. **Becerik S, Ozçaka O, Nalbantsoy A, Atilla G et al.** Effects of Menstrual Cycle on Periodontal Health and Gingival Crevicular Fluid Markers. *J Periodontol.* **2010**; 81(5): 673-81.
75. **Johannsen A, Bjurshamar N & Gustafsson A.** The influence of academic stress on gingival inflammation. *Int J Dent Hyg.* **2010**; 8(1): 22-7.
76. **Geivelis M, Turner DW, Pederson ED & Lamberts BL.** Measurements of Interleukin-6 in Gingival Crevicular Fluid From Adults With Destructive Periodontal Disease. *J Periodontol.* **1993**; 64(10): 980-3.
77. **Costa PP, Trevisan GL, Macedo GO, Palioto DB et al.** Salivary Interleukin-6, Matrix Metalloproteinase-8, and Osteoprotegerin in Patients With Periodontitis and Diabetes. *J Periodontol.* **2010**; 81(3): 384-91.
78. **Shimada Y, Komatsu Y, Ikezawa-Suzuki I, Tai H et al.** The Effect of Periodontal Treatment on Serum Leptin, Interleukin-6, and C-Reactive Protein. *J Periodontol.* **2010**; 81(8): 1118-23.
79. **Lin SJ, Chen YL, Kuo MY, Li CL & Lu HK.** Measurement of gp130 cytokines - Oncostatin M and IL-6 in gingival crevicular fluid of patients with chronic periodontitis. *Cytokine.* **2005**; 30(4):160-7.
80. **Teles RP, Likhari V, Socransky SS & Haffajee AD.** Salivary cytokine levels in subjects with chronic periodontitis and in periodontally healthy individuals: A cross-sectional study. *J Periodontal Res.* **2009**; 44(3): 411-7.
81. **D'Aiuto F, Nibali L, Parkar M, Suvan J & Tonetti MS.** Short-term effects of intensive periodontal therapy on serum inflammatory markers and cholesterol. *J Dent Res.* **2005**; 84(3): 269-73.
82. **Tonetti MS, D'Aiuto F, Nibali L, Donald A et al.** Treatment of periodontitis and endothelial function. *N Engl J Med.* **2007**; 356(9): 911-20.

83. **D'Aiuto F, Parkar M, Andreou G, Suvan J et al.** Periodontitis and systemic inflammation: Control of the local infection is associated with a reduction in serum inflammatory markers. *J Dent Res.* **2004**; 83(2): 156-60.
84. **Marcaccini AM, Meschiari CA, Zuardi LR, de Sousa TS et al.** Gingival crevicular fluid levels of MMP-8, MMP-9, TIMP-2, and MPO decrease after periodontal therapy. *J Clin Periodontol.* **2010**; 37(2): 180-90.
85. **O'Garra A, Barrat FJ, Castro AG, Vicari A & Hawrylowicz C.** Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease. *Immunol Rev.* **2008**; 223: 114-31.
86. **Houri-Haddad Y, Soskolne WA, Halabi A & Shapira L.** IL-10 gene transfer attenuates P. gingivalis-induced inflammation. *J Dent Res.* **2007**; 86(6): 560-4.
87. **Mosser DM & Zhang X.** Interleukin-10: New perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev.* **2008**; 226: 205-18.
88. **Mosman TR.** Properties and functions of interleukin-10. *Adv Immunol.* **1994**; 56: 1-26.
89. **Zhang Q, Chen B, Yan F, Guo J et al.** Interleukin-10 Inhibits Bone Resorption: A Potential Therapeutic Strategy in Periodontitis and Other Bone Loss Diseases. *Biomed Res Int.* **2014**.
90. **Lacraz S, Nicod LP, Chicheportiche R, Welgus HG & Dayer JM.** IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes. *J Clin Invest.* **1995**; 96(5):2304-10.
91. **Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, Souza AP, Brito RB et al.** Interleukin 10 gene promoter polymorphisms are associated with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* **2004**; 31(6): 443-8.
92. **Rousset F, Garcia E, Defrance T, Péronne C et al.** Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* **1992**; 89(5): 1890-3.
93. **Gemmell E & Seymour GJ.** Cytokine profiles of cells extracted from humans with periodontal diseases. *J Dent Res.* **1998**; 77(1): 16-26.
94. **Yamazaki K, Tabeta K, Nakajima T, Ohsawa Y et al.** Interleukin-10 gene promoter polymorphism in Japanese patients with adult and early-onset periodontitis. *J Clin Periodontol.* **2001**; 28(9): 828-32.
95. **Passoja A, Puijola I, Knuuttila M, Niemelä O et al.** Serum levels of interleukin-10 and tumour necrosis factor- α in chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* **2010**; 37(10): 881-7.
96. **Poole NM, Mamidanna G, Smith RA, Coons LB, Cole JA.** Prostaglandin E2 in tick saliva regulates macrophage cell migration and cytokine profile. *Parasit Vectors.* **2013**; 6(1): 261.
97. **Hasturk H, Kantarci A & Van Dyke TE.** Oral inflammatory diseases and systemic inflammation: Role of the macrophage. *Front Immunol.* **2012**; 3: 118.
98. **Mosser DM. & Edwards JP.** Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* **2008**; 8(12): 958-69.
99. **Mantovani, A.** From phagocyte diversity and activation to probiotics: Back to Metchnikoff. *European Journal of Immunology.* **2008**; 38(12): 3269-3273.
100. **Biswas SK, Chittezhath M, Shalova IN & Lim JY.** Macrophage polarization and plasticity in health and disease. *Immunol Res.* **2012**; 53(1-3): 11-24.

101. **Lappin DF, Kjeldsen M, Sander L & Kinane DF.** Inducible nitric oxide synthase expression in periodontitis. *J Periodontal Res.* **2000**; 35(6): 369-73.
102. **Ozmeriç N, Elgün S & Uraz A.** Salivary arginase in patients with adult periodontitis. *Clin Oral Investig.* **2000**; 4(1): 21-4.
103. **Hussain QA, Mckay IJ, Gonzales-Marin C & Allaker RP.** Detection of adrenomedullin and nitric oxide in different forms of periodontal disease. *J Periodontal Res.* **2016**; 51(1): 16-25.
104. **Gheren LW, Cortelli JR, Rodrigues E, Holzhausen M & Saad WA.** Periodontal therapy reduces arginase activity in saliva of patients with chronic periodontitis. *Clin Oral Investig.* **2008**; 12(1): 67-72.
105. **Güllü C, Ozmeric N, Tokman B, Elgün S & Balos K.** Effectiveness of scaling and root planing versus modified Widman flap on nitric oxide synthase and arginase activity in patients with chronic periodontitis. *J Periodontal Res.* **2005**; 40(2): 168-75.
106. **Williams H, Cassorla G, Pertsoulis N, Patel V et al.** Human classical monocytes display unbalanced M1/M2 phenotype with increased atherosclerotic risk and presence of disease. *Int Angiol.* **2017**; 36(2): 145-155.
107. **Wynn TA, Chawla A & Pollard JW.** Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature.* **2013**; 496(7446): 445-55.
108. **Lescoat A, Ballerie A, Jouneau S, Fardel O et al.** M1/M2 polarisation state of M-CSF blood-derived macrophages in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* **2018**.
109. **Holden JA, Attard TJ, Laughton KM et al.** Porphyromonas gingivalis Lipopolysaccharide Weakly Activates M1 and M2 Polarized Mouse Macrophages but Induces Inflammatory Cytokines. *Infect Immun.* **2014**; 82(10): 4190–4203.
110. **Navarrete M, García J, Dutzan N, Henríquez L et al.** Interferon- γ , Interleukins-6 and -4, and Factor XIII-A as Indirect Markers of the Classical and Alternative Macrophage Activation Pathways in Chronic Periodontitis. *J Periodontol.* **2014**; 85(5):751-60.
111. **Górska R, Gregorek H, Kowalski J, Laskus-Perendyk A et al.** Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* **2003**; 30(12): 1046-52.
112. **Liu YC, Lerner UH & Teng YT.** Cytokine responses against periodontal infection: Protective and destructive roles. *Periodontol 2000.* **2010**; 52(1): 163-206.
113. **Appert-Collin A, Hubert P, Crémel G & Bennisroune A.** Role of ErbB receptors in cancer cell migration and invasion. *Front Pharmacol.* **2015**; 6:283.
114. **Linggi B & Carpenter G.** ErbB receptors: new insights on mechanisms and biology. *Trends Cell Biol.* **2006**; 16(12): 649-56.
115. **Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM & Hynes NE.** ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J.* **1997**; 16(7): 1647–1655.
116. **Citri A, Skaria KB & Yarden Y.** Biologic Mechanisms and Role in Cancer. In: The EGF Receptor Family: **2003**.
117. **Schlessinger J & Lemmon MA.** Nuclear Signaling by Receptor Tyrosine Kinases: The First Robin of Spring. *Cell.* **2006**; 127(1): 45-8.

118. **Carpenter G.** The EGF Receptor Family: Biologic Mechanisms and Role in Cancer. **2003**.
119. **Higashiyama S, Abraham JA, Miller J, Fiddes JC & Klagsbrun M.** A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF. *Science*. **1991**; 251(4996): 936-9.
120. **Sasada R, Ono Y, Taniyama Y, Shing Y, Folkman J, Igarashi K.** Cloning and expression of cDNA encoding human betacellulin, a new member of the EGF family. *Biochem Biophys Res Commun*. **1993**; 190(3): 1173-9.
121. **Shing Y, Christofori G, Hanahan D, Ono Y, Sasada R et al.** Betacellulin: A mitogen from pancreatic β cell tumors. *Science*. **1993**; 259(5101): 1604-7.
122. **Toyoda H, Komurasaki T, Uchida D, Takayama Y et al.** Epiregulin. A novel epidermal growth factor with mitogenic activity for rat primary hepatocytes. *J Biol Chem*. **1995**; 270(13):7495-500.
123. **Jones JT, Akita RW & Sliwkowski MX.** Binding specificities and affinities of egf domains for ErbB receptors. *FEBS Lett*. **1999**; 447(2-3): 227-31.
124. **Strachan L, Murison JG, Prestidge RL, Sleeman MA et al.** Cloning and Biological Activity of Epigen, a Novel Member of the Epidermal Growth Factor Superfamily. *J Biol Chem*. **2001**; 276(21): 18265-71.
125. **Zhang D, Sliwkowski MX, Mark M, Frantz G et al.** Neuregulin-3 (NRG3): a novel neural tissue-enriched protein that binds and activates ErbB4. *Proc Natl Acad Sci USA*. **1997**; 94(18): 9562-7.
126. **Harari D, Tzahar E, Romano J, Shelly M et al.** Neuregulin-4: A novel growth factor that acts through the ErbB-4 receptor tyrosine kinase. *Oncogene*. **1999**; 18(17): 2681-9.
127. **Uchida T, Wada K, Akamatsu T, Yonezawa M et al.** A novel epidermal growth factor-like molecule containing two follistatin modules stimulates tyrosine phosphorylation of erbB-4 in MKN28 gastric cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. **1999**; 266(2): 593-602.
128. **Wang GX, Zhao XY, Meng ZX, Kern M2 et al.** The brown fat-enriched secreted factor Nrg4 preserves metabolic homeostasis through attenuation of hepatic lipogenesis. *Nat Med*. **2014**; 20(12): 1436-1443.
129. **Pfeifer A.** NRG4: An endocrine link between brown adipose tissue and liver. *Cell Metabolism*. **2015**; 21(1): 13-4.
130. **Yan P, Xu Y, Wan Q, Feng J et al.** Plasma Neuregulin 4 Levels Are Associated with Metabolic Syndrome in Patients Newly Diagnosed with Type 2 Diabetes Mellitus. *Dis Markers*. **2018**; (3): 1-11.
131. **Bernard JK, McCann SP, Bhardwaj V, Washington MK & Frey MR.** Neuregulin-4 is a survival factor for colon epithelial cells both in culture and in vivo. *J Biol Chem*. **2012**; 287(47): 39850-8.
132. **McElroy SJ, Castle SL, Bernard JK, Almohazey D et al.** The ErbB4 Ligand Neuregulin-4 Protects against Experimental Necrotizing Enterocolitis. *Am J Pathol*. **2014**; 184(10): 2768-78.
133. **Rosell M, Kaforou M, Frontini A, Okolo A et al.** Brown and white adipose tissues: intrinsic differences in gene expression and response to cold exposure in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. **2014**; 306(8): E945-64.

134. **Christian M.** Transcriptional fingerprinting of “browning” white fat identifies NRG4 as a novel adipokine. *Adipocyte*. **2014**; 4(1): 50-4.
135. **Villarroya F, Cereijo R, Villarroya J & Giralt M.** Brown adipose tissue as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol*. **2017**; 13(1): 26-35.
136. **Marshall C, Blackburn E, Clark M, Humphreys S & Gullick WJ.** Neuregulins 1-4 are expressed in the cytoplasm or nuclei of ductal carcinoma (in situ) of the human breast. *Breast Cancer Res Treat*. **2006**; 96(2):163-8.
137. **Dunn M, Sinha P, Campbell R, Blackburn E et al.** Co-expression of neuregulins 1,2,3 and 4 in human breast cancer. *J Pathol*. **2004**; 203(2): 672-80.
138. **Hayes NV, Blackburn E, Smart LV, Boyle MM et al.** Identification and characterization of novel spliced variants of neuregulin 4 in prostate cancer. *Clin Cancer Res*. **2007**; 13(11): 3147-55.
139. **Révillion F, Lhotellier V, Hornez L, Bonnetterre J, Peyrat JP.** ErbB/HER ligands in human breast cancer, and relationships with their receptors, the bio-pathological features and prognosis. *Ann Oncol*. **2008**; 19(1): 73-80.
140. **Ebi M, Kataoka H, Shimura T, Hirata Y et al.** The role of neuregulin4 and HER4 in gastrointestinal malignant lymphoma. *Mol Med Rep*. **2011**; 4(6):1151-5.
141. **Hayes NV, Blackburn E, Boyle MM, Russell GA et al.** Expression of neuregulin 4 splice variants in normal human tissues and prostate cancer and their effects on cell motility. *Endocr Relat Cancer*. **2010**; 18(1):39-49.
142. **Kobayashi H, Kumagai K, Gotoh A, Eguchi T et al.** Upregulation of epidermal growth factor receptor 4 in oral leukoplakia. *Int. J Oral Sci*. **2013**; 5(1): 14–20.
143. **Nielsen TO, Friis-Hansen L, Poulsen SS, Federspiel B & Sorensen BS.** Expression of the EGF family in gastric cancer: Downregulation of HER4 and its activating ligand NRG4. *PLoS One*. **2014**; 9(4): e94606.
144. **Cai C, Lin M, Xu Y, Li X et al.** Association of circulating neuregulin 4 with metabolic syndrome in obese adults: A cross-sectional study. *BMC Med*. **2016**; 14(1): 165.
145. **Kang YE, Kim JM, Choong S, Joung KH et al.** Comparison of serum Neuregulin 4 (Nrg4) levels in adults with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus and controls without diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. **2016**; 117: 1-3.
146. **Jiang J, Lin M, Xu Y, Shao J et al.** Circulating neuregulin 4 levels are inversely associated with subclinical cardiovascular disease in obese adults. *Sci Rep*. **2016**; 6:36710.
147. **Chen LL, Peng MM, Zhang JY, Hu X1 et al.** Elevated circulating Neuregulin4 level in patients with diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. **2017**; 33(4).
148. **Temur M, Calan M, Akşit M, Yılmaz Ö et al.** Increased serum neuregulin 4 levels in women with polycystic ovary syndrome: A Case-Control Study. *Ginekol Pol*. **2017**; 88(10): 517-522.
149. **Guo L, Zhang P, Chen Z, Xia H et al.** Hepatic neuregulin 4 signaling defines an endocrine checkpoint for steatosis-to-NASH progression. *J Clin Invest*. **2017**; 127(12): 4449-4461.
150. **Kim J, Lee T, Kim TH, Lee KT & Kim H.** An integrated approach of comparative genomics and heritability analysis of pig and human on obesity trait: Evidence for candidate genes on human chromosome 2. *BMC Genomics*. **2012**; 13: 711.

151. **Salinas YD, Wang L & DeWan AT.** Multiethnic genome-wide association study identifies ethnic-specific associations with body mass index in Hispanics and African Americans. *BMC Genet.* **2016**; 17(1): 78.
152. **Sandholm N, Salem RM, McKnight AJ, Brennan EP et al.** New Susceptibility Loci Associated with Kidney Disease in Type 1 Diabetes. *PLoS Genet.* **2012**; 8(9): e1002921.
153. **Frey MR, Edelblum KL, Mullane MT, Liang D & Polk DB.** The ErbB4 Growth Factor Receptor Is Required for Colon Epithelial Cell Survival in the Presence of TNF. *Gastroenterology.* **2009**; 136(1): 217-26.
154. **Naresh A, Long W, Vidal GA, Wimley WC et al.** The ERBB4/HER4 intracellular domain 4ICD is a BH3-only protein promoting apoptosis of breast cancer cells. *Cancer Res.* **2006**; 66(12): 6412-20.
155. **Löe H & Silness J.** Periodontal disease in pregnancy I. Prevalence and severity. *Acta Odontol Scand.* **1963**; 21: 533-51.
156. **Löe H.** The Gingival Index, the Plaque Index and the Retention Index Systems. *J Periodontol.* **1967**; 38(6): Suppl: 610-6.
157. **Mühlemann HR.** Psychological and chemical mediators of gingival health. *J Prev Dent.* **1977**; 4(4): 6-17.
158. **Rüdin HJ, Overdiek HF & Rateitschak KH.** Correlation between sulcus fluid rate and clinical and histological inflammation of the marginal gingiva. *Helv Odontol Acta.* **1970**; 14(1): 21-6.
159. **Burt B;** Research, Science and Therapy Committee of the American Academy of Periodontology. Position Paper: Epidemiology of Periodontal Diseases. *J Periodontol.* **2005**; 76(8):1406-19.
160. **Martinez-Martinez RE, Abud-Mendoza C, Patiño-Marin N, Rizo-Rodríguez JC et al.** Detection of periodontal bacterial DNA in serum and synovial fluid in refractory rheumatoid arthritis patients. *J Clin Periodontol.* **2009**; 36(12): 1004-10.
161. **Mealey BL & Rose LF.** Diabetes mellitus and inflammatory periodontal diseases. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* **2008**; 15(2): 135-41.
162. **Garcia RI, Henshaw MM & Krall EA.** Relationship between periodontal disease and systemic health. *Periodontol 2000.* **2001**; 25:21-36.
163. **Cullinan MP & Seymour GJ.** Periodontal disease and systemic illness: Will the evidence ever be enough? *Periodontol 2000.* **2013**; 62(1): 271-86.
164. **Ozçaka O, Biçakci N, Pussinen P, Sorsa T et al.** Smoking and matrix metalloproteinases, neutrophil elastase and myeloperoxidase in chronic periodontitis. *Oral Dis.* **2011**; 17(1): 68-76.
165. **Cetinkaya B, Güzeldemir E, Ogus E, Bulut S.** Proinflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines in Gingival Crevicular Fluid and Serum of Patients With Rheumatoid Arthritis and Patients With Chronic Periodontitis. *J Periodontol.* **2013**; 84(1): 84-93.
166. **Nakashima K, Giannopoulou C, Andersen E, Roehrich N et al.** A longitudinal study of various crevicular fluid components as markers of periodontal disease activity. *J Clin Periodontol.* **1996**; 23(9): 832-8.

167. **Teles R, Sakellari D, Teles F, Konstantinidis A et al.** Relationships Among Gingival Crevicular Fluid Biomarkers, Clinical Parameters of Periodontal Disease, and the Subgingival Microbiota. *J Periodontol.* **2010**; 81(1): 89-98.
168. **Figueredo CM, Areas A, Miranda LA, Fischer RG, Gustafsson A.** The short-term effectiveness of non-surgical treatment in reducing protease activity in gingival crevicular fluid from chronic periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* **2004**; 31(8):615-9.
169. **Türer ÇÇ, Durmuş D, Balli U, Güven B.** Effect of Non-Surgical Periodontal Treatment on Gingival Crevicular Fluid and Serum Endocan, Vascular Endothelial Growth Factor-A, and Tumor Necrosis Factor-Alpha Levels. *J Periodontol.* **2017**; 88(5): 493-501.
170. **Al-Shammari KF, Giannobile WV, Aldredge WA, Iacono VJ et al.** Effect of Non-Surgical Periodontal Therapy on C-Telopeptide Pyridinoline Cross-Links (ICTP) and Interleukin-1 Levels. *J Periodontol.* **2001**; 72(8): 1045-51.
171. **Trombelli L, Farina R, Silva CO, Tatakis DN.** Plaque-induced gingivitis: Case definition and diagnostic considerations. *J Periodontol.* **2018**; 89 (1): 46-73.
172. **Becerik S, Öztürk VÖ, Atmaca H, Atilla G, Emingil G.** Gingival Crevicular Fluid and Plasma Acute-Phase Cytokine Levels in Different Periodontal Diseases. *J Periodontol.* **2012**; 83(10):1304-13.
173. **Kaslick RS, Chasens AI, Weinstein D, Waldman R.** Ultramicromethod for the Collection of Gingival Fluid and Quantitative Analysis of Its Sodium Content. *J Dent Res.* **1968**; 47(6):1192.
174. **Griffiths GS.** Formation, collection and significance of gingival crevice fluid. *Periodontol 2000.* **2003**; 31:32-42.
175. **Skapski H & Lehner T.** A crevicular washing method for investigating immune components of crevicular fluid in man. *J Periodontal Res.* **1976**; 11(1):19-24.
176. **Challacombe SJ, Russell MW & Hawkes J.** Passage of intact IgG from plasma to the oral cavity via crevicular fluid. *Clin Exp Immunol.* **1978**; 34(3): 417-422.
177. **Figueredo CM, Ribeiro MS, Fischer RG, Gustafsson A.** Increased Interleukin-1 β Concentration in Gingival Crevicular Fluid as a Characteristic of Periodontitis. *J Periodontol.* **1999**; 70(12):1457-63.
178. **Ozkavaf A, Aras H, Huri CB, Yamalik N et al.** Analysis of factors that may affect the enzymatic profile of gingival crevicular fluid: Sampling technique, sequential sampling and mode of data presentation. *J Oral Sci.* **2001**; 43(1):41-8.
179. **Trombelli L, Tatakis DN, Scapoli C, Bottega S et al.** Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis: II. Identification of 'high-responder' and 'low-responder' subjects. *J Clin Periodontol.* **2004**; 31(4):239-52.
180. **Lamster IB, Ahlo JK.** Analysis of gingival crevicular fluid as applied to the diagnosis of oral and systemic diseases. *Ann N Y Acad Sci.* **2007**; 1098: 216-29.
181. **Egelberg J.** Permeability of the dento-gingival blood vessels: III. Chronically inflamed gingivae. *J Periodontal Res.* **1966**; 1(4):287-96.
182. **Ozkavaf A, Aras H, Huri CB, Mottaghian-Dini F et al.** Relationship between the quantity of gingival crevicular fluid and clinical periodontal status. *J Oral Sci.* **2000**; 42(4):231-8.

183. **Hancock EB, Cray RJ & O'Leary TJ.** The Relationship Between Gingival Crevicular Fluid and Gingival Inflammation: A Clinical and Histologic Study. *J Periodontol.* **1979**; 50(1):13-9.
184. **Griffiths GS, Sterne JA, Wilton JM, Eaton KA, Johnson NW.** Associations between volume and flow rate of gingival crevicular fluid and clinical assessments of gingival inflammation in a population of British male adolescents. *J Clin Periodontol.* **1992**; 19(7):464-70.
185. **Buchmann R, Hasilik A, Van Dyke TE, Lange DE.** Resolution of Crevicular Fluid Leukocyte Activity in Patients Treated for Aggressive Periodontal Disease. *J Periodontol.* **2002**; 73(9):995-1002.
186. **Tüter G, Kurtiş B & Serdar M.** Interleukin-1beta and thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) levels after phase I periodontal therapy in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol.* **2001**; 72(7):883-8.
187. **Smita QT, Hinrichs JE & Melnyk RS.** Gingival crevicular fluid myeloperoxidase at periodontitis sites. *J Periodontal Res.* **1986**; 21(1):45-55.
188. **Huri CB, Yamalik N, Kiliç K, Kiliç A et al.** Analysis of the relationship between the severity of periodontal destruction and proteoglycan metabolism of gingiva and gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol.* **2003**; 30(11):961-8.
189. **Ustün K, Alptekin NO.** The effect of tobacco smoking on gingival crevicular fluid volume. *Eur J Dent.* **2007**; 1(4): 236-9.
190. **Bergmann A, Deinzer R.** Daytime variations of interleukin-1beta in gingival crevicular fluid. *Eur J Oral Sci.* **2008**; 116(1): 18-22.
191. **Cimasoni G.** Crevicular fluid updated. *Monogr Oral Sci.* **1983**; 12:3-7, 1-152.
192. **Bıyıkoglu B, Buduneli N, Kardeşler L, Aksu K et al.** Gingival Crevicular Fluid MMP-8 and -13 and TIMP-1 Levels in Patients With Rheumatoid Arthritis and Inflammatory Periodontal Disease. *J Periodontol.* **2009**; 80(8):1307-14.
193. **Emingil G, Gürkan A, Atilla G, Kantarci A.** Subantimicrobial-Dose Doxycycline and Cytokine-Chemokine Levels in Gingival Crevicular Fluid. *J Periodontol.* **2011**; 82(3):452-61.
194. **Thaweboon B, Laohapand P, Amornchat C, Matsuyama J et al.** Host BETA-globin gene fragments in crevicular fluid as a biomarker in periodontal health and disease. *J Periodontal Res.* **2010**; 45(1):38-44.
195. **Keles GC, Cetinkaya BO, Isildak I, Koprulu H, Acikgoz G.** Levels of platelet activating factor in gingival crevice fluid following periodontal surgical therapy. *J Periodontal Res.* **2006**; 41(6):513-8. x
196. **Fiorini T, Susin C, da Rocha JM, Weidlich P et al.** Effect of nonsurgical periodontal therapy on serum and gingival crevicular fluid cytokine levels during pregnancy and postpartum. *J Periodontal Res.* **2013**; 48(1):126-33.
197. **Wassall RR. & Preshaw PM.** Clinical and technical considerations in the analysis of gingival crevicular fluid. *Periodontol 2000.* **2016**; 70(1):65-79.
198. **Chapple IL, Matthews JB, Thorpe GH, Glenwright HD et al.** A new ultrasensitive chemiluminescent assay for the site-specific quantification of alkaline phosphatase in gingival crevicular fluid. *J Periodontal Res.* **1993**; 28(4):266-73.

199. **Lin Y, Yang X, Yue W, Xu X et al.** Chemerin aggravates DSS-induced colitis by suppressing M2 macrophage polarization. *Cell Mol Immunol.* **2014**; 11(4):355-66.
200. **Arranz A, Doxaki C, Vergadi E, Martínez de la Torre Y et al.** Akt1 and Akt2 protein kinases differentially contribute to macrophage polarization. *Proc Natl Acad Sci USA.* **2012**; 109(24):9517-22.
201. **Hunter MM, Wang A, Parhar KS, Johnston MJ et al.** In Vitro-Derived Alternatively Activated Macrophages Reduce Colonic Inflammation in Mice. *Gastroenterology.* **2010**; 138(4):1395-405.
202. **Feng Y, Tsai YH, Xiao W, Ralls MW et al.** Loss of ADAM17-Mediated Tumor Necrosis Factor Alpha Signaling in Intestinal Cells Attenuates Mucosal Atrophy in a Mouse Model of Parenteral Nutrition. *Mol Cell Biol.* **2015**; 35(21):3604-21.
203. **Feng Y & Teitelbaum DH.** Epidermal growth factor/TNF- α transactivation modulates epithelial cell proliferation and apoptosis in a mouse model of parenteral nutrition. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **2012**; 302(2):G236-49.
204. **Wang GX, Zhao XY & Lin JD.** The brown fat secretome: Metabolic functions beyond thermogenesis. *Trends Endocrinol Metab.* **2015**; 26(5):231-7.
205. **Slattery ML, Pellatt DF, Mullany LE, Wolff RK.** Differential gene expression in colon tissue associated with diet, lifestyle, and related oxidative stress. *PLoS One.* **2015**; 10(7):e0134406.
206. **Chen Z, Wang GX, Ma SL, Jung DY et al.** Nrg4 promotes fuel oxidation and a healthy adipokine profile to ameliorate diet-induced metabolic disorders. *Mol Metab.* **2017**; 6(8):863-872.
207. **Yan P, Xu Y, Zhang Z, Gao C et al.** Decreased plasma neuregulin 4 levels are associated with peripheral neuropathy in Chinese patients with newly diagnosed type 2 diabetes: A cross-sectional study. *Cytokine.* **2019**; 113:356-364.
208. **Zhang L, Fu Y, Zhou N, Cheng X, Chen C.** Circulating neuregulin 4 concentrations in patients with newly diagnosed type 2 diabetes: a cross-sectional study. *Endocrine.* **2017**; 57(3):535-538.
209. **Dai YN, Zhu JZ, Fang ZY, Zhao DJ et al.** A case-control study: Association between serum neuregulin 4 level and non-alcoholic fatty liver disease. *Metabolism.* **2015**; 64(12):1667-73.
210. **Zhang L, Bai M, Tang H, Zhou F et al.** Role of hepatic neuregulin 4 in the regulation of gluconeogenesis in mice. *Life Sci.* **2019**; 217:185-192.
211. **Wang R, Yang F, Qing L, Huang R et al.** Decreased serum neuregulin 4 levels associated with non-alcoholic fatty liver disease in children with obesity. *Clin Obes.* **2019**; 9(1):e12289.
212. **Herzig S, Long F, Jhala US, Hedrick S et al.** CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature.* **2001**; 413(6852):179-83.
213. **Kinney JS, Morelli T, Oh M, Braun TM et al.** Crevicular fluid biomarkers and periodontal disease progression. *J Clin Periodontol.* **2014**; 41(2):113-120.
214. **Nibali L, Fedele S, D'Aiuto F & Donos N.** Interleukin-6 in oral diseases: a review. *Oral Dis.* **2012**; 8(3):236-43.

215. **Mogi M, Otogoto J, Ota N, Inagaki H et al.** Interleukin 1 β , interleukin 6, β 2-microglobulin, and transforming growth factor- α in gingival crevicular fluid from human periodontal disease. *Arch Oral Biol.* **1999**; 44(6):535-9.
216. **Lee HJ, Kang IK, Chung CP, Choi SM.** The subgingival microflora and gingival crevicular fluid cytokines in refractory periodontitis. *J Clin Periodontol.* **1995**; 22(11):885-90.
217. **Guillot JL, Pollock SM & Johnson RB.** Gingival Interleukin-6 Concentration Following Phase I Therapy. *J Periodontol.* **1995**; 66(8):667-72.
218. **Keles ZP, Keles GC, Avci B, Cetinkaya BO, Emingil G.** Analysis of YKL-40 Acute-Phase Protein and Interleukin-6 Levels in Periodontal Disease. *J Periodontol.* **2014**; 85(9):1240-6.
219. **Goutoudi P, Diza E & Arvanitidou M.** Effect of periodontal therapy on crevicular fluid interleukin-6 and interleukin-8 levels in chronic periodontitis. *Int J Dent.* **2012**; 2012:362905.
220. **Kornman KS, Crane A, Wang HY, di Giovine FS.** The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol.* **1997**; 24(1):72-7.
221. **Gemmell E & Seymour GJ.** Interleukin 1, interleukin 6 and transforming growth factor- β production by human gingival mononuclear cells following stimulation with *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*. *J Periodontol Res.* **1993**; 28(2):122-9.
222. **de Waal Malefyt R, Yssel H & de Vries JE.** Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4 $^{+}$ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. *J Immunol.* **1993**; 150(11):4754-65.
223. **Goutoudi P, Diza E & Arvanitidou M.** Effect of periodontal therapy on crevicular fluid interleukin-1 β and interleukin-10 levels in chronic periodontitis. *J Dent.* **2004**; 32(7):511-20.
224. **Toker H, Poyraz O & Eren K.** Effect of periodontal treatment on IL-1 β , IL-1 α , and IL-10 levels in gingival crevicular fluid in patients with aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol.* **2008**; 35(6):507-13.
225. **Morris DL, Singer K & Lumeng CN.** Adipose tissue macrophages: Phenotypic plasticity and diversity in lean and obese states. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* **2011**; 14(4):341-6.
226. **Shaker O, Ghallab NA, Hamdy E & Sayed S.** Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in gingival tissues of chronic periodontitis with and without diabetes: Immunohistochemistry and RT-PCR study. *Arch Oral Biol.* **2013**; 58(10):1397-406.
227. **Muià C, Mazzon E, Maiere D, Zito D et al.** Pyrrolidine dithiocarbamate reduced experimental periodontitis. *Eur J Pharmacol.* **2006**; 539(3):205-10.
228. **Lohinai Z, Benedek P, Fehér E, Györfi A et al.** Protective effects of mercaptoethylguanidine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase, in ligature-induced periodontitis in the rat. *Br J Pharmacol.* **1998**; 123(3):353-60.
229. **Lohinai Z, Stachlewitz R, Virág L, Székely AD et al.** Evidence for reactive nitrogen species formation in the gingivomucosal tissue. *J Dent Res.* **2001**; 80(2):470-5.
230. **Hirose M, Ishihara K, Saito A, Nakagawa T et al.** Expression of Cytokines and Inducible Nitric Oxide Synthase in Inflamed Gingival Tissue. *J Periodontol.* **2001**; 72(5):590-7.
231. **Pan Z, Guzeldemir E, Toygar HU, Bal N, Bulut S.** Nitric Oxide Synthase in Gingival Tissues of Patients With Chronic Periodontitis and With and Without Diabetes. *J Periodontol.* **2010**; 81(1):109-20.

232. **Lucarini G, Tirabassi G, Zizzi A, Balercia G et al.** Uncoupling of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) in Gingival Tissue of Type 2 Diabetic Patients. *Inflammation*. **2016**; 39(2):632-42.
233. **Artese L, Piattelli A, de Gouveia Cardoso LA, Ferrari DS et al.** Immunoexpression of Angiogenesis, Nitric Oxide Synthase, and Proliferation Markers in Gingival Samples of Patients With Aggressive and Chronic Periodontitis. *J Periodontol*. **2010**; 81(5):718-26.
234. **Kendall HK, Haase HR, Li H, Xiao Y & Bartold PM.** Nitric oxide synthase type-II is synthesized by human gingival tissue and cultured human gingival fibroblasts. *J Periodontol Res*. **2000**; 35(4):194-200.
235. **Batista AC, Silva TA, Chun JH & Lara VS.** Nitric oxide synthesis and severity of human periodontal disease. *Oral Dis*. **2002**; 8(5):254-60.
236. **Ozer L, Elgün S, Özdemir B, Pervane B & Özmeriç N.** Arginine-nitric oxide-polyamine metabolism in periodontal disease. *J Periodontol*. **2011**; 82(2):320-8.
237. **Menaka K, Ramesh A, Thomas B & Kumari NS.** Estimation of nitric oxide as an inflammatory marker in periodontitis. *J Indian Soc Periodontol*. **2009**; 13(2):75-8.
238. **Kendall HK, Marshall RI & Bartold PM.** Nitric oxide and tissue destruction. *Oral Dis*. **2001**; 7(1):2-10.
239. **Clancy RM, Amin AR & Abramson SB.** The role of nitric oxide in inflammation and immunity. *Arthritis Rheum*. **1998**; 41(7):1141-51.
240. **Kaufman E & Lamster IB.** The diagnostic applications of saliva - A review. *Crit Rev Oral Biol Med*. **2002**; 13(2):197-212.

EKLER

EK 1: BAİBÜ Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı

ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU ONAYI ABANT İZZET BAYSAL UNIVERSITY CLINICAL RESEARCHES ETHICS COMMITTEE APPROVAL

Sayı : 16

15.1/2018

Konu: Kararlar

BAŞVURU BİLGİLERİ (APPLICATION INFORMATION)	ARAŞTIRMANIN ADI (TITLE OF THE PROJECT)	Periodontal Hastalık ve Sağıkta Dişeti Oluğu Sıvısı ve Serum ErbB4/Neuregulin-4 Seviyelerinin Değerlendirilmesi.
	SORUMLU ARAŞTIRMACI (PRINCIPAL INVESTIGATOR)	Yrd. Doç. Dr. Şadiye GÜNPINAR
	DİĞER ARAŞTIRMACILAR (OTHER INVESTIGATORS)	Arş. Gör. Bilge MERACI, Dokt. Öğr. Niyazi DÜNDAR
	ARAŞTIRMA MERKEZİ (RESEARCH CENTER)	AİBÜ Diş Hekimliği Fakültesi Selçuk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi

KARAR (DECISION)	Karar no (Decision No): 2017/113	Tarih (Date): 28.12.2017
	Yrd. Doç. Dr. Şadiye GÜNPINAR'ın sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma dosyası ve ilgili belgelerin incelenmesi sonucunda araştırmanın gerçekleştirilmesinde etik yönden sakınca olmadığına mevcudun oy birliği/oy çokluğu ile karar verilmiştir.	

Üyeler	Uzmanlık alanı	Kurumu	İmzası
Prof. Dr. Nebil YILDIZ (Başkan)	Nöroloji AD	Tıp Fakültesi	
Prof. Dr. Safiye GÜREL (Başkan Yrd.)	Radyoloji AD	Tıp Fakültesi	
Prof. Dr. Özge UZUN (Üye)	Farmakoloji AD	Tıp Fakültesi	
Doç. Dr. Hüsamettin ÇAKICI (Üye)	Ortopedi ve Travmatoloji AD	Tıp Fakültesi	
Doç. Dr. Mervan BEKDAŞ (Üye)	Çocuk Sağıkı ve Hastalıkları AD	Tıp Fakültesi	Katılmadı
Doç. Dr. İsa YILDIZ (Üye)	Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD	Tıp Fakültesi	İznilisi
Yrd. Doç. Dr. Erkan KILINÇ (Bildirimlerden sorumlu üye)	Fizyoloji AD	Tıp Fakültesi	
Yrd. Doç. Dr. Oya KALAYCIOĞLU (Üye)	Biyoistatistik	AİBÜ	
Yrd. Doç. Dr. Mustafa Hayati ATALA (Üye)	Protetik Diş Tedavisi	AİBÜ Diş Hekimliği	
Yrd. Doç. Dr. Tamer ÇANKAYA (Üye)	Fizik Tedavi	AİBÜ	İznilisi
Yrd. Doç. Dr. Makbule TOKUR KESGİN (Üye)	Hemşirelik	AİBÜ Bolu Sağık Yüksek Okulu	
Yrd. Doç. Dr. Kutlu AYDIN (Üye)	Antrenörlük	AİBÜ BESYO	
Hatice Selen SÖYLEMEZ (Üye)	Eczacı	Özel	
Av. Huri Hülya GÜNEŞ COŞKUN (Üye)	Hukukçu	Özel Hukuk Bürosu	
Ramazan KAYNARPINAR (Sivil-Üye)	Esnaf	Serbest Meslek (BOLU)	

EK 2: Bilgilendirilmiş gönüllü olur formu

KLİNİK ÇALIŞMAYA KATILMAK İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Sizin A.İ.B.Ü Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı tarafından yürütülen bu çalışmaya katılmanızı arzu ediyoruz. Bu katıldığınız çalışma bilimsel bir araştırma olup, araştırmanın adı “ Periodontal Hastalık ve Sağıkta Dişeti Oluğu Sıvısı ve Serum ErbB4/Neuregulin-4 Seviyelerinin Değerlendirilmesi”dir. Aşağıda bu çalışma ile ilgili bazı bilgiler bulacaksınız. Bu bilgiler size konunun açıklanması için düzenlenmiştir.

Amaç:

Bu çalışmada amaç, dişeti hastalığı olan ve olmayan (dişetleri sağlıklı) bireylerin kan ve dişeti sıvılarındaki dişeti hastalığına neden olabileceği düşünülen Neuregulin-4 ve reseptörü (almacı) ErbB4 düzeylerinin belirlenmesi ve karşılaştırılmasıdır. Ayrıca bu proteinlerin dişeti tedavisi sonrası düzeylerindeki değişimin incelenmesi de bu araştırmanın ikincil amacıdır. Bu çalışma ile değerlendirilen “Neuregulin-4” ve “ErbB4” isimli iki proteinin, toplumun büyük bir kesimi etkileyen dişeti hastalığının erken teşhisinde önemli bir belirteç olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmanın süresi ve uygulanacak tedavi:

Bu çalışma, dişeti hastalığı bulunan ve dişetleri sağlıklı olan toplam **80 adet birey** ile gerçekleştirilecektir. Çalışmaya katılmayı kabul eden bireylerin çalışma kapsamında kalacağı süre **6 (altı) haftadır**. Çalışmaya katılan gönüllülerin, araştırmanın başlangıcındaki iki hafta içerisinde üç kez, sonrasında ise bir kere kontrole gelmeleri gerekmektedir. Çalışmaya katılım tamamen isteğe bağlı olup, değerlendirme yapılan bireylerin diledikleri zaman, istekleri doğrultusunda çalışma dışında kalabilme hakları vardır. Böyle bir karar Diş hekimliği Fakültesi'nin hizmetlerinden yararlanmanıza etki etmeyecektir.

Bu araştırma kapsamında hastalara temel tedavi olan dişlerin ve diş köklerinin üzerinde bulunan diştaşlarının temizliği yapılacaktır. Sonrasında tüm hastalarımıza dişeti hastalığının nasıl geliştiği, ağız bakımlarını nasıl yapmaları gerektiği ve ağız bakımlarını yapmadıkları takdirde ilerde nelerle karşılaşabilecekleri konusunda bilgilendirileceklerdir. Tedavi sonrasında dişlerde üşüme, dişlerin sallanmasında artış ve dişetlerinde kanamalar olabilir. Bu durum geçici bir süreç olup, doktorunuzun önerdiği ağız bakım yöntemlerini uygulamanız durumunda bu şikayetleriniz gün geçtikçe azalacak ve dişetleriniz iyileştiğinde tamamen ortadan kalkacaktır. Hastalardan tedavi öncesinde ve sonrasında vücut sıvıları olan **dişeti sıvısı** ve **kan örnekleri** alınacaktır. Dişeti sıvısı ağız ortamından, kan örnekleri ise kolunuzdan alınacaktır. Bu çalışmada yer alan bireylere hiçbir ödeme yapılmayacaktır; ayrıca, bu araştırma kapsamındaki bütün muayene ve tedavi hizmetleri için sizden veya bağlı bulunduğunuz sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyecektir.

Araştırmacı bilginiz dahilinde veya isteğiniz dışında, uygulanan tedavi şemasının gereklerini yerine getirmemeniz veya çalışma programını aksatmanız vb. nedenlerle sizi çalışmadan çıkarabilir. Araştırmanın sonuçları bilimsel amaçla kullanılacaktır; çalışmadan çekilmeniz ya da araştırmacı tarafından çıkarılmanız durumunda, sizle ilgili tıbbi veriler de gerekirse bilimsel amaçla kullanılabilir.

Size ait tüm tıbbi ve kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır ve araştırma yayınlansa bile kimlik bilgileriniz verilmeyecektir, ancak araştırmanın izleyicileri, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar gerektiğinde tıbbi bilgilerinize ulaşabilir. Siz de kendinize ait tıbbi bilgilere çalışmanın tamamlanması ve bulguların analiz edilmesinden sonra ulaşabilirsiniz.

Çalışmanın yürütücüsü Yrd.Doç.Dr. Şadiye GÜNPINAR ve araştırmacısı Arş. Gör. Bilge MERACI'dır. Çalışmaya dahil olan bireylerin çalışma ile ilgili soruları en kısa sürede yanıtlanacaktır. Sorular doğrudan araştırma yürütücüsüne de sorulabilir. Bu konuda gerekirse 0374 254 1000-8404 numaralı telefonu ve coskunersadiye@gmail.com / bilgemrc@gmail.com e-mail adreslerini kullanabilirsiniz.

Çalışmaya Katılma Onayı:

Yukarıda yer alan ve araştırmaya başlanmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri okudum ve sözlü olarak dinledim. Aklıma gelen tüm soruları araştırmacıya sordum, yazılı ve sözlü olarak bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Yapılacak olan tedavinin başarılı olacağı veya tatminkar sonuç elde edileceği konusunda hiçbir garanti, teminat veya söz verilmedi. Çalışmaya katılmayı isteyip istemediğime dair karar vermeye için bana yeterli zaman tanındı. Bu koşullar altında, bana ait tıbbi bilgilerin gözden geçirilmesi, transfer edilmesi ve işlenmesi konusunda araştırma yürütücüsüne yetki veriyorum ve söz konusu araştırmaya ilişkin bana yapılan katılım davetini hiçbir zorlama ve baskı olmaksızın büyük bir gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

Bu formun imzalı bir kopyası bana verilecektir.

Gönüllünün	Açıklamaları yapan araştırmacının
Adı:	Adı:
Soyadı:	Soyadı:
Adresi:	Adresi:
Telefonu:	Telefonu:
İmzası:	İmzası:

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin;

Adı, Soyadı ve Görevi:

Adresi ve telefonu:

İmzası:

EK 3: Anamnez formu

ANAMNEZ FORMU

Tarih:

1. Hastanın adı ve soyadı:
2. Adres ve Tel:
3. Mesleği:
4. Cinsiyeti: ☐ Kadın ☐ Erkek
5. Yaş (gün/ay/yıl)/...../.....
6. Boy:..... Kilo:..... VKİ (kg/m²):..... Bel çevresi:.....
7. Eğitim durumu ☐ ≥ 12 YIL (üniversite) ☐ 5-11 YIL (ortaokul-lise) ☐ ≤ 4 YIL (ilkokul)
8. Gelir düzeyi ☐ < 1000 ₺ ☐ 1000-3000 ₺ ☐ >3000 ₺
9. Sigara maruziyeti ☐ Hiç kullanmadım ☐ Kullandım bıraktım ☐ Kullanıyorum
10. Günlük sigara kullanımı (adet/gün)
11. Alkol kullanımı ☐ Evet ☐ Hayır

Lütfen sağlığınıza ilgili aşağıdaki soruları EVET-HAYIR kutucuklarını işaretleyecek şekilde cevaplayınız.

12. Kalp rahatsızlığı veya diğer bir kalp damar hastalığınız var mı? ☐ EVET ☐ HAYIR
(cevabınız EVET ise aşağıdaki kutucuklardan size uygun olanı işaretleyiniz.)
☐ Göğüs ağrısı (anjina pektoris) ☐ Kalp krizi (miyokard infarktüsü) ☐ Kalp romatizması
☐ Kalp kapak hastalığı ☐ Doğuştan gelen kalp hastalığı ☐ Kalp pili
☐ Yüksek tansiyon ☐ Felç ☐ Kolesterol
 13. Diyabet (Şeker Hastalığı) hastalığınız var mı? ☐ EVET ☐ HAYIR
 14. Daha önce Hepatit (Sarılık) geçirdiniz mi? ☐ EVET ☐ HAYIR
(cevabınız EVET ise aşağıdaki kutucuklardan uygun olan/olanları işaretleyiniz.)
☐ Hepatit A (kirli sularla bulaşan) ☐ Hepatit B (Kan ile bulaşan) ☐ Hepatit C (Kan ile bulaşan)
 15. Böbrek hastalığınız var mı? ☐ EVET ☐ HAYIR
 16. Herhangi bir kan hastalığınız var mı? ☐ EVET ☐ HAYIR
(cevabınız EVET ise aşağıdaki kutucuklardan uygun olan/olanları işaretleyiniz.)
☐ Anemi(kansızlık) ☐ Lösemi ☐ Hemofili
 17. Yaralanma durumunda kanamanız uzun sürer mi? ☐ EVET ☐ HAYIR
 18. Daha önce tüberküloz (verem) veya diğer bir akciğer hastalığı geçirdiniz mi? ☐ EVET ☐ HAYIR
 19. Astım, sinüzit, KOAH ve ya diğer bir solunum probleminiz var mı? ☐ EVET ☐ HAYIR
 20. Guatr hastalığınız var mı? ☐ EVET ☐ HAYIR
 21. Size iltihaplı eklem romatizması teşhisi konuldu mu? ☐ EVET ☐ HAYIR
 22. Bayılma, titreme veya epilepsi (sara) nöbetleri hiç geçirdiniz mi? ☐ EVET ☐ HAYIR
 23. Tümör veya kanser nedeniyle ameliyat, radyoterapi, ilaç tedavisi uygulandı mı? ☐ EVET ☐ HAYIR
 24. Herhangi bir ciddi enfeksiyon hastalığı geçirdiniz mi (AIDS, Zührevi Hastalıklar vb.)? ☐ EVET ☐ HAYIR
 25. Organ nakli geçirdiniz mi? ☐ EVET ☐ HAYIR
 26. Düzenli kullandığınız ilaç var mı? ☐ EVET ☐ HAYIR
(Cevabınız EVET ise aşağıdaki kutucuklardan uygun olan/olanları işaretleyiniz.)
☐ Kan sulandırıcı ☐ Diyabet (Şeker) ilacı ☐ Tansiyon ilacı
☐ Epilepsi ilacı ☐ Tiroid ilacı ☐ Astım, KOAH ilacı
☐ Bağışıklık sistemini baskılayan ilaçlar (kortizon türevi) ☐ Kolesterol ilacı
☐ Bifosfonatlar ☐ Psikiyatri ilaçları
 27. Son 3 aydır antibiyotik kullandınız mı? ☐ EVET ☐ HAYIR
 28. Son 6 ayda diyeti tedavisi gördünüz mü? ☐ EVET ☐ HAYIR
- Sadece kadın hastaların cevaplandıracağı sorular (29-31 arasındaki sorulardır)**
29. Adet dönemlerinizde düzensizlik var mı? ☐ EVET ☐ HAYIR
 30. Doğum kontrol hapı kullanıyor musunuz? ☐ EVET ☐ HAYIR
 31. Emzirme döneminde misiniz? ☐ EVET ☐ HAYIR
 32. Menopoz döneminde misiniz? ☐ EVET ☐ HAYIR

EK 4: Klinik periodontal parametre değerlendirme formu

AD-SOYAD:

KOD:

TARİH:

[illegible]

DOS ALINAN BÖLGELER				
PERİOTRON SKORU				
MİKROLİTRE				

ÖZGEÇMİŞ

Bilge Meracı 1991 yılında İstanbul’da doğdu. İlkokul ve ortaokul öğrenimini Kanarya İlkokulu’nda 2006’da, lise öğrenimini Çapa Fen Lisesi’nde 2009 yılında tamamladı. 2009 yılında girdiği İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi’nden 2014 yılında mezun oldu. 2015 yılında Abant İzzet Baysal Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı’nda uzmanlık eğitimine başladı. O tarihten itibaren aynı bölümde araştırma görevlisi olarak çalışmakta ve uzmanlık öğrenimine devam etmektedir.